



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

INFEÇÃO DO TRATO URINÁRIO POR *ESCHERICHIA COLI* EM CÃES E GATOS:  
MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS  $\beta$ -LACTÂMICOS

ANDREIA DA SILVA FRANCO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz  
Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba  
Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de Oliveira

ORIENTADOR

Dr. Abel Gomes de Almeida

COORDINADORA

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba

2017

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

INFEÇÃO DO TRATO URINÁRIO POR *ESCHERICHIA COLI* EM CÃES E GATOS:  
MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS  $\beta$ -LACTÂMICOS

ANDREIA DA SILVA FRANCO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz  
Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba  
Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de Oliveira

ORIENTADOR

Dr. Abel Gomes de Almeida

COORDINADORA

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba

2017

LISBOA

---

*“Os olhos do meu cão enternecem-me. Em que rosto humano, num outro mundo, vi eu já estes olhos de veludo doirado, de cantos ligeiramente macerados, com este mesmo olhar pueril e grave, entre interrogativo e ansioso?”*

Florbela Espanca



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais por nunca terem deixado de acreditar em mim e me terem possibilitado a concretização deste sonho de ser Médica Veterinária. Por me terem inculcado amor e respeito pelos animais.

Ao meu orientador, Dr. Abel Almeida, por me ter proporcionado um estágio enriquecedor no Centro Veterinário Sintra, pela confiança depositada e conhecimentos transmitidos.

À Professora Doutora Maria Constança Pomba por, prontamente, ter aceite ser minha coorientadora. Pela oportunidade de estagiar no Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas e me ter proposto o tema de estudo que culminou com a realização desta dissertação. Agradeço, também, toda a amabilidade, simpatia e paciência.

A toda a equipa do Centro Veterinário Sintra: Abel Almeida, Diogo Machado, Inês Apolinário, Inês Silva, Juan Torre, Mafalda Santos, Margarida Arrobas, Margarida Costa, Sofia Arrobas e Teresa Umbelino. Obrigado por me integrarem na equipa, por toda a ajuda e momentos de boa disposição.

A toda a equipa do Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas, Adriana Belas e Cátia Marques, por toda a sabedoria transmitida e preciosa ajuda na realização e correção desta dissertação. Um agradecimento especial à Cátia Marques por me ter acompanhado de mais perto durante a rotina laboratorial e por todas as palavras de incentivo quando tudo parecia mais difícil.

À minha irmã por me ter apoiado ao longo de todo este percurso e pelo seu constante interesse e preocupação.

Aos amigos que fiz nesta instituição e que sem os quais esta árdua jornada seria, certamente, mais difícil.

Aos meus amigos de sempre, “Manas” e “Umelices”.

Ao Tiago, pelo apoio incondicional, apesar de todos os “raspanetes”.

A todos os animais que passaram pela minha vida e que tanto me inspiraram, em especial à Shelly, Julieta, Kiara e Tico. Aos meus “afilhados” Ghost e Jonas.

A todas as outras pessoas que de alguma forma influenciaram este meu percurso.

Um sincero obrigada a todos!



## Resumo

### Infeção do trato urinário por *Escherichia coli* em cães e gatos: mecanismos moleculares de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos

A infecção do trato urinário (ITU) é uma afeição frequentemente observada em clínica de animais de companhia, sendo uma das razões mais comuns para instituição de terapêutica antimicrobiana. *Escherichia coli* é o principal agente patogénico bacteriano associado a ITU. A resistência antimicrobiana de *E. coli* aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos representa um problema de saúde pública emergente uma vez que estes são frequentemente utilizados tanto em medicina veterinária como humana. O objetivo deste estudo foi caracterizar estirpes de *E. coli* isoladas de animais de companhia com ITU quanto aos mecanismos moleculares de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e grupos filogenéticos, marcadores de urovirulência/comensalismo. Além disso, pretendeu-se investigar a tendência temporal de resistência à amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) e cefalosporinas de terceira geração (C3G) durante um período de 16 anos (1999-2014). A suscetibilidade antimicrobiana de 415 estirpes de *E. coli* foi determinada pelo método de difusão em disco. Os breakpoints clínicos foram aplicados de acordo com as orientações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A análise estatística das tendências temporais da resistência antimicrobiana foi determinada pelo modelo de regressão logística do SAS. Um total de 303 estirpes de *E. coli* foram caracterizadas. O grupo filogenético foi determinado por multiplex-PCR. As estirpes resistentes à AMC foram rastreadas por PCR para deteção de genes que codificam  $\beta$ -Lactamases de Espectro Alargado (*Extended-Spectrum Beta-Lactamases*, ESBL) (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>) enquanto que as estirpes resistentes às C3G foram ainda rastreadas para a presença de ESBL (*bla*<sub>CTX-M</sub>) e AmpC (*bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>CIT</sub>, *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>MIR</sub>, *bla*<sub>ACT</sub>). Considerando o período de tempo de 1999 a 2014, 16,8% e 11,2% das estirpes eram resistentes à AMC e C3G, respetivamente. Além disso, foi observado um aumento estatisticamente significativo da resistência à AMC ( $p < 0,0001$ ) e C3G ( $p < 0,0001$ ) durante o período do estudo. Nas estirpes de *E. coli* resistentes a AMC, os genes mais frequentemente detetados foram *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>OXA-1</sub>. A resistência às C3G deveu-se, principalmente, à presença dos genes *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>CMY</sub>. O filogrupo patogénico B2 foi o mais frequente. O aumento da resistência de *E. coli* à AMC e C3G observada neste estudo é preocupante, especialmente porque estes são compostos antimicrobianos criticamente importantes (*Critically Important Antimicrobials*, CIA) para o Homem. Este estudo destaca a importância de uma monitorização contínua dos padrões de resistência, a fim de uma utilização antimicrobiana prudente, uma vez que a resistência bacteriana tem um impacto não só na qualidade de vida do animal de estimação, mas também na saúde humana.

Palavras-chave: infecção do trato urinário (ITU), animais de companhia, *E. coli*, resistência antimicrobiana,  $\beta$ -lactâmicos





## Abstract

### ***Escherichia coli* urinary tract infection in dogs and cats: molecular resistance mechanisms to $\beta$ -lactam antibiotics**

Urinary tract infection (UTI) is a frequent clinical problem in companion animals and among the most common reasons for antimicrobial therapy. *Escherichia coli* is the main bacterial pathogen associated with UTIs. Antimicrobial resistance of *E. coli* to  $\beta$ -lactam antibiotics is an emerging public health concern since  $\beta$ -lactams are frequently used in veterinary and human medicine. The aim of this study was to characterize *E. coli* strains isolated from companion animals with UTI for the molecular resistance mechanisms to  $\beta$ -lactam antibiotics and phylogenetic groups, markers of urovirulence/commensalism. Furthermore, it aimed to investigate the temporal trends of antimicrobial resistance to amoxicillin/clavulanate (AMC) and third-generation cephalosporin (3GC) over a period of 16 years (1999-2014). Antimicrobial susceptibility of the 415 *E. coli* isolates was determined by disk diffusion method. Clinical breakpoints were applied according to *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) guidelines. Statistical analysis of antimicrobial resistance temporal trends was determined by logistic regression model of SAS. A total of 303 *E. coli* were further characterized. The determination of *E. coli* phylogenetic group was conducted by multiplex PCR. AMC resistant isolates were screened by PCR for ESBL (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>) and 3GC resistant isolates were further screened for the presence of Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) (*bla*<sub>CTX-M</sub>) and AmpC (*bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>CIT</sub>, *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>MIR</sub>, *bla*<sub>ACT</sub>). Considering the 1999-2014 time period, 16.8% and 11.2% were resistant to AMC and 3GC, respectively. Furthermore, statistically significant increase of the resistance to AMC ( $p < 0.0001$ ) and 3GC ( $p < 0.0001$ ) was observed during the study period. Among AMC resistant *E. coli*, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>OXA-1</sub> were the most detected genes. 3GC resistance was mainly due to the presence of *bla*<sub>CTX-M</sub> and *bla*<sub>CMY</sub>. The pathogenic phylogroup B2 was the most frequent. The significant increase in *E. coli* AMC and 3GC resistance over time observed in the study is worrying, especially because these are critically important antimicrobials (CIA) for humans. This study highlights the importance of a continuous monitoring of the resistance patterns in order to use antibiotics prudently, since bacterial resistance has an impact not only on companion animal's quality of life, but also on human health.

Keywords: Urinary tract infection (UTI), companion animals, *E. coli*, antimicrobial resistance,  $\beta$ -lactams



## Índices

### Índice Geral

1 – Prefácio .....	1
2 – Introdução.....	5
2.1 – Infecção do trato urinário em animais de companhia .....	5
2.1.1 – Definição .....	5
2.1.2 – Epidemiologia.....	5
2.1.3 – Etiologia .....	6
2.1.3.1 – <i>E. coli</i> .....	7
2.1.4 – Sinais clínicos.....	9
2.1.5 – Diagnóstico.....	9
2.1.5.1 – Urianálise.....	10
2.1.5.2 – Urocultura .....	10
2.1.5.3 – Teste de Suscetibilidade a Antibióticos (TSA).....	11
2.1.6 – Tratamento .....	12
2.1.6.1 – ITUs não complicadas.....	12
2.1.6.2 – ITUs complicadas .....	13
2.2 – Antibióticos $\beta$ -lactâmicos .....	13
2.2.1 – Características gerais.....	13
2.2.2 – Mecanismo de ação .....	14
2.2.3 – Principais classes .....	15
2.2.3.1 – Penicilinas.....	15
2.2.3.2 – Cefalosporinas .....	15
2.2.3.3 – Carbapenemos .....	16
2.2.3.4 – Monobactamos .....	16
2.2.3.5 – Inibidores das $\beta$ -lactamases.....	16
2.2.4 – Antibióticos $\beta$ -lactâmicos em medicina veterinária e humana .....	17
2.3 – Problemática da resistência a antibióticos .....	17
2.3.1 – Resistência bacteriana aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos em Portugal e na Europa...	19
2.3.2 – Disseminação de Resistência.....	20
2.3.2.1 – Plasmídeos .....	21
2.3.3 – Mecanismos de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos .....	21
2.3.3.1 – Modificação do alvo dos antibióticos .....	22
2.3.3.2 – Impermeabilização da membrana .....	22
2.3.3.3 – Bombas de efluxo .....	23
2.3.3.4 – Produção de enzimas – $\beta$ -lactamases .....	23
2.4 – $\beta$ -lactamases .....	23
2.4.1 – Classificação das $\beta$ -lactamases.....	23
2.4.1.1 – $\beta$ -lactamases TEM .....	26
2.4.1.2 – $\beta$ -lactamases SHV .....	26
2.4.1.3 – $\beta$ -lactamases CTX-M .....	27
2.4.1.4 – $\beta$ -lactamases OXA .....	28
2.4.1.5 – $\beta$ -Lactamases AmpC.....	29
2.4.2 – ESBL e AmpC em animais de companhia .....	30
3 – Objetivos.....	32
4 – Materiais e métodos.....	32
4.1 – Caracterização da amostra.....	32
4.2 – Isolamento bacteriano .....	32

4.3 – Extração de ADN.....	33
4.4 – TSA .....	33
4.5 – PCR.....	34
4.5.1 – Confirmação da espécie e classificação quanto à filogenia .....	34
4.5.2 – Detecção de genes que codificam para as $\beta$ -lactamases .....	35
4.5.2.1 – Detecção de genes que codificam para as $\beta$ -lactamases do tipo TEM, SHV e OXA.....	35
4.5.2.2 – Detecção de genes que codificam para as $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M e identificação do respetivo grupo.....	36
4.5.2.3 – Detecção de genes que codificam para as $\beta$ -lactamases do tipo AmpC .....	39
4.6 – Eletroforese .....	40
4.7 – Purificação dos produtos amplificados.....	41
4.8 – Sequenciação.....	41
4.9 – Análise estatística.....	41
5 – Resultados.....	41
5.1 – Caracterização da amostra.....	41
5.2 – Caracterização global da resistência das estirpes de <i>E. coli</i> aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos .....	43
5.3 – Evolução da resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos entre 1999 e 2014 .....	43
5.4 – Caracterização do perfil de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos das estirpes recuperadas .....	45
5.5 – Caracterização genotípica das estirpes recuperadas .....	46
5.6 – Caracterização filogenética das estirpes recuperadas .....	48
6 – Discussão .....	50
7 – Conclusão.....	57
8 – Bibliografia .....	58
9 – Anexos.....	80
Anexo 1 – Resumo aceite para Comunicação em Poster no XII Congresso do Hospital Veterinário Montenegro, 2016, Santa Maria da Feira, Porto.....	80
Anexo 2 – Resumo aceite para Comunicação em Poster no XII Congresso do Hospital Veterinário Montenegro, 2016, Santa Maria da Feira, Porto.....	82
Anexo 3 – Resumo aceite para Comunicação Livre no XII Congresso do Hospital Veterinário Montenegro, 2016, Santa Maria da Feira, Porto .....	84
Anexo 4 – Resumo aceite para Comunicação em Poster no 26 <sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases - 2016, Amesterdão, Holanda .....	86
Anexo 5 – Resumo aceite para Comunicação em Poster no ASM MICROBE - 2016, Boston, Massachusetts, EUA .....	88

## Índice de Figuras

Figura 1 – Representação de <i>E. coli</i> .....	7
Figura 2 – Árvore dicotómica para determinação do grupo filogenético das estirpes de <i>E. coli</i> de acordo com os resultados da amplificação por PCR dos genes <i>chuaA</i> e <i>yjaA</i> e do fragmento de ADN TspE4.C2 .....	9
Figura 3 – Estrutura básica do anel $\beta$ -lactâmico .....	13
Figura 4 – Estrutura química dos principais grupos de $\beta$ -lactâmicos.....	14
Figura 5 – Efeito da pressão seletiva dos antibióticos nas bactérias.....	18
Figura 6 – Ciclo de transmissão de <i>E. coli</i> resistente a antibióticos .....	18
Figura 7 – Percentagem (%) de resistência de <i>E. coli</i> à amoxicilina/ácido clavulânico e cefalosporinas de 3 <sup>a</sup> geração por país nos anos 2012-2013.....	19
Figura 8 – Processos de transformação, transdução e conjugação .....	20
Figura 9 – Mecanismos de resistência bacteriana.....	22
Figura 10 – Distribuição geográfica dos vários tipos de ESBL e AmpC produzidos por <i>E. coli</i> em animais de companhia .....	31

Figura 11 – Aspetto das colónias de <i>E. coli</i> em MAC.....	33
Figura 12 – Medição do diâmetro dos halos de inibição e observação de sinergia positiva pelo método de difusão em disco de Kirby-Bauer.....	34
Figura 13 – Multiplex-PCR para classificação filogenética das estirpes de <i>E. coli</i> .....	35
Figura 14 – Multiplex-PCR para deteção dos genes <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> e <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> nas estirpes de <i>E. coli</i> .....	36
Figura 15 – PCR para deteção do gene <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> nas estirpes de <i>E. coli</i> .....	37
Figura 16 – PCR para deteção de CTX-M grupo 1 nas estirpes de <i>E. coli</i> .....	38
Figura 17 – PCR para deteção de CTX-M grupo 9 nas estirpes de <i>E. coli</i> .....	38
Figura 18 – Multiplex-PCR para deteção dos genes <i>bla</i> <sub>MOX</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub> , <i>bla</i> <sub>DHA</sub> , <i>bla</i> <sub>ACC</sub> , <i>bla</i> <sub>MIR</sub> e <i>bla</i> <sub>FOX</sub> nas estirpes de <i>E. coli</i> .....	40
Figura 19 – Distribuição das amostras por espécie animal .....	42
Figura 20 – Distribuição das amostras de cães por género.....	42
Figura 21 – Distribuição das amostras de gatos por género .....	42
Figura 22 – Evolução temporal da resistência das estirpes de <i>E. coli</i> à ampicilina, à amoxicilina/ácido clavulânico e às cefalosporinas de terceira geração .....	44
Figura 23 – Percentagem de estirpes de <i>E. coli</i> resistentes e suscetíveis à amoxicilina/ácido clavulânico a cada dois anos .....	44
Figura 24 – Percentagem de estirpes de <i>E. coli</i> resistentes e suscetíveis às cefalosporinas de terceira geração a cada dois anos .....	45
Figura 25 – Frequência relativa das estirpes de <i>E. coli</i> recuperadas consoante o grupo filogenético .....	49
Figura 26 – Frequência relativa das estirpes de <i>E. coli</i> , suscetíveis a todos os antibióticos β-lactâmicos testados, consoante o grupo filogenético .....	49
Figura 27 – Frequência relativa das estirpes de <i>E. coli</i> , resistentes a pelo menos um dos antibióticos β-lactâmicos testados, consoante o grupo filogenético .....	50

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Interpretação de uroculturas quantitativas em cães e gatos de acordo com o método de colheita de urina.....	10
Tabela 2 – Abordagem terapêutica em cães e gatos com ITU.....	12
Tabela 3 – Classificação das cefalosporinas em várias gerações de acordo com a sua atividade antimicrobiana .....	16
Tabela 4 – Evolução da classificação das β-lactamases ao longo dos anos.....	24
Tabela 5 – Classificação das β-lactamases bacterianas.....	25
Tabela 6 – Distribuição das β-lactamases CTX-M pelos cinco grupos .....	27
Tabela 7 – Origem das β-lactamases AmpC em Enterobacteriaceae .....	29
Tabela 8 – Presença de <i>E. coli</i> produtoras de ESBL e AmpC em cães e gatos por ordem cronológica de data de publicação.....	31
Tabela 9 – Lista de oligonucleótidos iniciadores, com as respetivas sequências nucleotídicas, tamanho de produto de PCR e referência, utilizados na técnica de PCR para classificação filogenética das estirpes de <i>E. coli</i> .....	35
Tabela 10 – Lista de oligonucleótidos iniciadores, com respetivas sequências nucleotídicas, tamanho de produto de PCR e referência, utilizados na técnica de PCR para deteção dos genes <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> e <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> nas estirpes de <i>E. coli</i> .....	36
Tabela 11 – Lista de oligonucleótidos iniciadores, com respetivas sequências nucleotídicas, tamanho de produto de PCR e referência, utilizados na técnica de PCR para deteção do gene <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> nas estirpes de <i>E. coli</i> .....	37
Tabela 12 – Lista de oligonucleótidos iniciadores, com respetivas sequências nucleotídicas, tamanho de produto de PCR e referência, utilizados na técnica de PCR para determinação do grupo de CTX-M nas estirpes de <i>E. coli</i> .....	39
Tabela 13 – Lista de oligonucleótidos iniciadores, com respetivas sequências nucleotídicas, tamanho de produto de PCR e referência, utilizados na técnica de PCR para deteção dos genes <i>bla</i> <sub>MOX</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub> , <i>bla</i> <sub>DHA</sub> , <i>bla</i> <sub>ACC</sub> , <i>bla</i> <sub>MIR</sub> e <i>bla</i> <sub>FOX</sub> nas estirpes de <i>E. coli</i> .....	40
Tabela 14 – Frequência das resistências obtidas aos antibióticos β-lactâmicos testados em animais de companhia, pela bactéria <i>E. coli</i> no período de 1999-2014.....	43

Tabela 15 – Perfil de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos das estirpes de <i>E. coli</i> recuperadas.....	45
Tabela 16 – Genes de resistência detetados nas estirpes de <i>E. coli</i> de acordo com o seu perfil de resistência.....	46
Tabela 17 – Caracterização das estirpes de <i>E. coli</i> produtoras de ESBL e AmpC .....	48
Tabela 18 – Distribuição dos vários genes de resistência consoante o grupo filogenético ...	50

## Índice de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

$\mu$ g	– Micrograma
$\mu$ L	– Microlitro
$\mu$ M	– Micromolar
ADN	– Ácido Desoxirribonucleico
AIEC	– <i>Adherent-Invasive E. coli</i> , <i>E. coli</i> Aderente-Invasiva
AMC	– Amoxicilina/Ácido clavulânico
AMP	– Ampicilina
ASM	– <i>American Society for Microbiology</i>
BHIB	– <i>Brain-heart infusion broth</i> , Caldo de cérebro e coração
CAZ	– Ceftazidima
CIA	– <i>Critically Important Antimicrobials</i>
CLSI	– <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	– Concentração Mínima Inibitória
CTX	– Cefotaxima
CVN	– Cefovecina
CVS	– Centro Veterinário Sintra
DNTPs	– Desoxirribonucleotídeos trifosfato
DRC	– Doença Renal Crónica
DTUIF	– Doença do Trato Urinário Inferior Felino
DU	– Densidade Urinária
EAEC	– <i>Enteragggregative E. coli</i> , <i>E. coli</i> Enteroagregativa
ECCMID	– <i>European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
ECDC	– <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
ECL	– <i>Reference Laboratory for Escherichia coli</i>
EDTA	– <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> , Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EHEC	– <i>Enterohemorrhagic E. coli</i> , <i>E. coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	– <i>Enteroinvasive E. coli</i> , <i>E. coli</i> Enteroinvasiva
EMA	– <i>European Medicines Agency</i>
EPEC	– <i>Enteropathogenic E. coli</i> , <i>E. coli</i> Enteropatogénica
EPI	– Equipamento de Proteção Individual
ESBL	– <i>Extended-Spectrum Beta-Lactamases</i> , $\beta$ -Lactamases de Espectro Alargado
ETEC	– <i>Enterotoxigenic E. coli</i> , <i>E. coli</i> Enterotoxinogénica
EUA	– Estados Unidos da América
EUCAST	– <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
ExPEC	– <i>Extra-Intestinal Pathogenic E. coli</i> , <i>E. coli</i> Patogénica Extra Intestinal
FC	– Frequência Cardíaca
FMV-ULisboa	– Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
FOX	– Cefoxitina
FR	– Frequência Respiratória
h	– Horas
IF	– Infecção de Feridas
InPEC	– <i>Intestinal Pathogenic E. coli</i> , <i>E. coli</i> Patogénica Intestinal
IRT	– <i>Inhibitor-resistant TEM</i> , TEM resistente aos inibidores
ITG	– Infecção do Trato Gastrointestinal
ITR	– Infecção do Trato Respiratório
ITU	– Infecção do Trato Urinário
kg	– Quilograma
LCC	– Ligamento Cruzado Cranial

LRAB – Laboratório de Resistência a Antibióticos e Biocidas  
 MAC – MacConkey Agar  
 mg – Miligrama  
 MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio  
 MHA – Mueller Hinton Agar  
 MIMV – Mestrado Integrado em Medicina Veterinária  
 mL – Mililitro  
 mM – Milimolar  
 MRSA – *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* Meticilina-Resistente  
 NaCl – Cloreto de sódio  
 NAG – N-acetilglucosamina  
 NAM – N-acetilmurânico  
 ND – Não Detetado  
 NE – Não Especificado  
 NEMEC – *Neonatal Meningitis E. coli*, *E. coli* associada a Meningite Neonatal  
 OVH – Ovariohisterectomia  
 pAmpC – *Plasmid-Mediated AmpC*, AmpC mediadas por plasmídeo  
 pb – par de bases  
 PCR – *Polymerase Chain Reaction*, Reação em Cadeia da Polimerase  
 PLPs – Proteínas de Ligação à Penicilina  
 PO – *per os*, Via Oral  
 q – Em cada  
 r – Resistente  
 SEPEC – *Septicemic E. coli*, *E. coli* associada a Sepsis  
 SHV – *Sulfhydryl Variable*, Variável Sulfidrila  
 TAE – Tris-Acetato-EDTA  
 TRC – Tempo de Repleção Capilar  
 TSA – Teste de Suscetibilidade a Antibióticos  
 UFC – Unidades Formadoras de Colónias  
 UPEC – *Uropathogenic E. coli*, *E. coli* Uropatogénica  
 DU – Densidade Urinária  
 V – Volt  
 WHO – *World Health Organization*  
 Zn<sup>2+</sup> – Ião Zinco





## **1 – Prefácio**

Consciente da abrangência da profissão médico-veterinária considerei importante realizar o meu estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV) em dois locais distintos: no Centro Veterinário Sintra (CVS) e no Laboratório de Resistência a Antibióticos e Biocidas (LRAB) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa). A primeira parte do estágio, no CVS, teve como principal objetivo a aquisição de aptidões a nível clínico. A segunda parte, realizada no LRAB da FMV-ULisboa, apresentou uma componente laboratorial.

O estágio curricular no CVS efetuado sob orientação do Dr. Abel Almeida e coorientação da Professora Doutora Maria Constança Pomba teve a duração de seis meses, tendo início a 13 de outubro de 2014 e término a 30 de abril de 2015. Durante este período foi-me possível adquirir experiência nos diversos serviços que compõem um hospital veterinário, nomeadamente, medicina interna, cirurgia, internamento, imagiologia e laboratório.

Na área de medicina interna tive a possibilidade de assistir a diversas consultas e auxiliar o médico veterinário em vários procedimentos, tais como: contenção dos pacientes, preparação e administração de fármacos orais e injetáveis, preparação e administração de vacinas, preparação de sistemas de soro, colocação de cateteres endovenosos, colheita de sangue para análises gerais, limpeza e desinfeção de feridas, execução de citologias, realização de pensos, entre outros. As consultas mais frequentemente observadas foram as de vacinação e desparasitação, sendo também muito comuns as consultas relacionadas com distúrbios gastrointestinais. Assisti, também, a consultas de especialidade, nomeadamente Comportamento, sendo-me possível estar presente nas primeiras consultas, assim como nas consultas de acompanhamento, permitindo avaliar a evolução dos animais. Quanto às consultas de urgência, as mais comumente observadas foram atropelamentos, envenenamentos e torções gástricas. Esta área possibilitou não só colocar em prática os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do curso, mas também a aquisição de competências no contacto e abordagem com os clientes, de extrema importância para esta profissão.

No serviço de cirurgia tive a oportunidade de acompanhar cirurgias de tecidos moles, ortopedia, odontologia e oftalmologia. As ovariectomias (OVH) e orquiectomias foram as cirurgias de tecidos moles mais frequentemente observadas, sendo as nodulectomias também bastante comuns. Foram também assistidas mastectomias, gastropexias e gastrotomias. De salientar que algumas das OVH acompanhadas foram realizadas por laparoscopia. Em ortopedia foi possível assistir a resoluções de fraturas com recurso a placas, fixadores externos e cavilhas, resolução de roturas do ligamento cruzado cranial (LCC) e cirurgias para amputação de membros. Relativamente à odontologia foram observadas extrações dentárias e destartarizações. Resoluções de entrópion foram as cirurgias de

oftalmologia acompanhadas. Nesta área tive oportunidade de desempenhar várias funções que incluíam a preparação do paciente para a cirurgia, monitorização anestésica e auxiliar o cirurgião. Os procedimentos relacionados com a preparação do paciente compreendiam a colocação do cateter endovenoso e respetivo sistema de soro, preparação e administração da pré-medicação, tricotomia e lavagem e desinfeção da região cirúrgica. No bloco operatório tive a possibilidade de proceder à monitorização do animal durante toda a cirurgia, compreendendo frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR), temperatura corporal, tempo de repleção capilar (TRC), coloração das mucosas e reflexos palpebrais. Em algumas cirurgias tive a oportunidade de auxiliar o cirurgião, nomeadamente na colocação de afastadores cirúrgicos, pinças hemostáticas e compressão de vasos. Posteriormente à cirurgia era-me permitido a realização de pensos simples e o acompanhamento dos pacientes com monitorização durante a recuperação anestésica e pós-operatório.

No internamento tive a oportunidade de desempenhar várias tarefas, nomeadamente: preenchimento das fichas com os dados de cada paciente; realização de exames físicos dos animais, como monitorização da FC e FR, temperatura, pulso, TRC e coloração das mucosas; preparação e administração de medicação; colocação de cateteres e sistemas de soro, com cálculo da taxa de fluidoterapia adequada ao animal; colheita de sangue para realização de análises laboratoriais; monitorização contínua de pacientes críticos; limpeza das boxes; alimentação e passeio dos animais. Na unidade de doenças infecciosas as atividades foram realizadas com recurso a equipamento de proteção individual (EPI) e seguindo sempre regras de segurança, evitando assim o contágio de outros animais assim como dos colaboradores do hospital.

Na área de imagiologia foi-me possível acompanhar a realização de radiografias e ecografias. No serviço de radiologia e ecografia tive oportunidade de auxiliar os médicos veterinários na contenção e posicionamento dos pacientes, assim como na monitorização anestésica nos casos em que para a execução de determinado exame se recorria a sedação ou anestesia geral.

Por fim, no laboratório do CVS, foi-me permitido realizar as seguintes tarefas: análises sanguíneas gerais, como hemograma e perfil bioquímico recorrendo a aparelhos especializados; análises de urina recorrendo a fitas reagentes para avaliação bioquímica, refratómetro para medir a densidade urinária (DU) e microscópio para análise de sedimento após centrifugação; citologias com realização de coloração Gram.

De salientar que todas as atividades mencionadas neste relatório foram supervisionadas por um médico veterinário.

Esta primeira parte do estágio contribuiu para um enriquecimento profissional e pessoal. Permitiu consolidar os conhecimentos práticos e teóricos recebidos ao longo do percurso académico, tornando mais vasto o meu conhecimento médico-veterinário. Foi também de

extrema importância para o desenvolvimento de capacidade comunicativa e de trabalho em equipa, fundamental para exercer esta atividade profissional.

O estágio no LRAB da FMV-ULisboa decorreu entre 4 de maio de 2015 e 31 de outubro de 2015, compreendendo um período de cinco meses, tendo sido este o local onde foi desenvolvido o trabalho que constitui a base desta dissertação de MIMV. No decurso deste período foi-me possível adquirir conhecimentos relativos à prática laboratorial, tanto na área da bacteriologia como na área da biologia molecular.

No âmbito da bacteriologia tive a oportunidade de executar diversas tarefas nomeadamente: preparação de meios de cultura, tanto sólidos como líquidos; isolamento de colónias em meios sólidos; realização e leitura de testes de suscetibilidade a antibióticos (TSA). No que diz respeito à biologia molecular os procedimentos desenvolvidos foram: extração de ácido desoxirribonucleico (ADN), reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) e eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose.

Durante este estágio, que teve a colaboração da Professora Doutora Maria Constança Pomba e da Dr.<sup>a</sup> Cátia Marques e da Engenheira Adriana Belas, ambas estudantes de doutoramento em Ciências Veterinárias, tive a oportunidade de obter experiência numa área não tão explorada ao longo do curso. Considero que este estágio tenha contribuído de uma maneira bastante positiva na minha formação uma vez que me permitiu trabalhar de uma forma próxima e independente a nível laboratorial, aumentando as minhas habilitações como médica veterinária. Foi também importante a nível pessoal visto que trabalhar em laboratório exige organização, método e trabalho em equipa.

A escolha do tema desta dissertação “Infeção do trato urinário por *Escherichia coli* em cães e gatos: mecanismos moleculares de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos” justifica-se não só pela relevância clínica da infeção do trato urinário em animais de companhia, mas também pela abordagem ao problema atual da resistência aos antibióticos.

O aumento da resistência aos antibióticos constitui uma ameaça real, representando, mundialmente, uma enorme preocupação tanto a nível da medicina humana como da medicina veterinária. Torna-se fulcral a realização de estudos que permitam um melhor conhecimento deste assunto, de forma a implementar medidas que diminuam o impacto deste problema (Weese, 2008). *E. coli* é a bactéria mais frequentemente isolada em ITU em animais de companhia, apresentando, muitas vezes, mecanismos de resistência aos antibióticos. Em Portugal, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são os compostos antimicrobianos utilizados com maior frequência em clínica de animais de companhia (EMA, 2016), sendo do maior interesse avaliar a resistência de *E. coli* a esta classe de antibióticos.

No que diz respeito aos animais de companhia, recentemente, têm sido realizados, um pouco por todo mundo, estudos que se propõem a avaliar a evolução da resistência da bactéria *E. coli* (Cummings, Aprea & Altier, 2015; Rzewuska et al., 2015; Marques et al., 2016). No entanto, é um tema que continua, ainda, a carecer de muita informação, o que motivou a

realização deste trabalho. No presente estudo é utilizado um número elevado (n=415) de estirpes bacterianas provenientes de animais de companhia com ITU, recolhidas durante um período de tempo marcadamente mais longo (16 anos) do que qualquer um dos estudos previamente realizados. Pretende-se, desta forma, avaliar a evolução da resistência de *E. coli* presente em ITU em animais de companhia no nosso país, particularmente na área da grande Lisboa. Adicionalmente, o presente trabalho pretende caracterizar os principais mecanismos moleculares responsáveis por essa resistência.

Parte dos resultados apresentados na presente dissertação foram objeto de divulgação científica como comunicação em poster no XII Congresso do Hospital Veterinário Montenegro (“Oncologia sem segredos”), de 20 a 21 de fevereiro de 2016, no Europarque de Santa Maria da Feira, no qual participei como autora:

Franco, A., Belas, A., Marques, C., Telo da Gama, L. & Pomba, C. (2016). Resistance to amoxicillin/clavulanate and third-generation cephalosporins in uropathogenic *E. coli* from companion animals. *XII Congresso do Hospital Veterinário Montenegro*, 20-21 fevereiro 2016, Santa Maria da Feira, Porto, Portugal (Anexo 1).

Também neste congresso foram apresentados dois trabalhos, um como comunicação em poster (Anexo 2) e outro como comunicação livre (Anexo 3), onde tive a possibilidade de participar como coautora:

Salas, C., Marques, C., Belas, A., Franco, A., Aboim, C., Telo da Gama, L. & Pomba, C. (2016). Rational empirical antimicrobial therapy (FRAT) for UTI in companion animal. *XII Congresso do Hospital Veterinário Montenegro*, 20-21 fevereiro 2016, Santa Maria da Feira, Porto, Portugal (Anexo 2);

Marques, C., Belas, A., Couto, N., Franco, A., Aboim, C., Telo da Gama, L. & Pomba, C. (2016). Emergence of major international high-risk clones in companion animals with urinary tract infection: 16 years retrospective study in Portugal. *XII Congresso do Hospital Veterinário Montenegro*, 20-21 fevereiro 2016, Santa Maria da Feira, Porto, Portugal (Anexo 3).

Em abril de 2016 tive a oportunidade de participar como coautora, num poster apresentado no 26<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Amesterdão, Holanda (Anexo 4):

Belas, A., Marques, C., Franco, A. & Pomba, C. (2016). Spread of major human ESBL and AmpC-producing *Escherichia coli* lineages in companion animals with UTI over 17 years in Portugal. 26<sup>th</sup> ECCMID, 9-12 abril 2016, Amesterdão, Holanda.

Por fim, em junho de 2016, foi-me possível participar como coautora, num poster apresentado no American Society for Microbiology (ASM) Microbe 2016, Boston, Estados Unidos da América (EUA) (Anexo 5):

Belas, A., Marques, C., Franco, A. & Pomba, C. F. (2016). Companion animals are reservoirs of high-risk human ESBL and AmpC-producing *Escherichia coli* Lineages. *ASM Microbe 2016*, 20 junho 2016, Boston, EUA.

## **2 – Introdução**

### **2.1 – Infecção do trato urinário em animais de companhia**

#### **2.1.1 – Definição**

A infecção do trato urinário (ITU) caracteriza-se por uma quebra temporária ou permanente dos mecanismos de defesa do hospedeiro o que possibilita a adesão, multiplicação e persistência de um agente infeccioso no sistema urogenital (Smee, Loyd & Grauer, 2013a). A infecção pode encontrar-se limitada a um único local do trato urinário, como pélvis renal (pielonefrite), ureter (ureterite), bexiga (cistite), uretra (uretrite), próstata (prostatite), vagina (vaginite), ou dois ou mais destes locais (Bartges, 2004; Smee et al., 2013a). Neste último caso, a ITU é geralmente classificada quanto à localização como trato urinário superior (rins e ureteres) e trato urinário inferior (bexiga, uretra, e próstata ou vagina) (Bartges, 2004).

As ITUs podem ser classificadas em simples ou complicadas, por sua vez, estas últimas, podem ser agrupadas em ITUs persistentes ou ITUs recorrentes. Nas ITUs recorrentes distingue-se recidiva de reinfeção. A ITU simples ou não complicada ocorre esporadicamente em indivíduos saudáveis, que não apresentam anomalias anatômicas ou funcionais do trato urinário (Weese et al., 2011). Por sua vez, na ITU complicada existem alterações anatômicas ou funcionais, do trato urinário ou doenças concomitantes que predispõem o paciente a infecções persistentes, infecções recorrentes ou falhas na terapêutica (Orenstein & Wong, 1999). A ITU persistente, como o próprio nome indica, verifica-se quando a infecção persiste apesar de terapêutica adequada ao agente (Weese et al., 2011). A ITU recorrente é definida pela presença de três ou mais episódios de ITU durante um período de 12 meses (Weese et al., 2011). Esta, por sua vez, pode ser classificada em recidiva ou reinfeção (Weese et al., 2011). A recidiva diz respeito à recorrência da ITU num período de seis meses após o término da infecção anterior, quando, aparentemente, o tratamento havia sido bem-sucedido, sendo o agente uropatogénico o mesmo que o isolado na primeira ITU (Weese et al., 2011). A reinfeção caracteriza-se por um retorno da ITU num prazo de seis meses após o término da infecção anterior, quando, aparentemente, o tratamento havia sido bem-sucedido, sendo o agente isolado diferente do da primeira ITU (Weese et al., 2011).

#### **2.1.2 – Epidemiologia**

A prevalência de ITU em cães e gatos é muito variável (Bartges, 2004). Na espécie canina estima-se que 14% dos animais venham a desenvolver ITU ao longo da sua vida, sendo as fêmeas mais frequentemente afetadas do que os machos (Chew, DiBartola & Schenck, 2011). Existe um estudo que aponta para a maior frequência de ITU em cadelas de idade avançada, a partir dos oito/dez anos (Ling et al., 2001). No entanto, a idade média de diagnóstico, independentemente do sexo, é de sete/oito anos (Ling et al., 2001; Cohn, Gary, Fales & Madsen, 2003; Seguin, Vaden, Altier, Stone & Levine, 2003). Fêmeas esterilizadas apresentam maior risco de desenvolver ITU (Cohn et al., 2003; Seguin et al., 2003). Doenças

sistêmicas como doença renal crônica (DRC), hiperadrenocorticismo, diabetes *mellitus* e neoplasias sistêmicas podem causar uma falha dos mecanismos de defesa do hospedeiro predispondo os cães a ITU (Sykes & Westropp, 2014).

Em gatos a ocorrência de ITU é menos frequente do que em cães (Chew et al., 2011; Sykes & Westropp, 2014). Com o avançar da idade verifica-se uma maior probabilidade de desenvolver ITU, sendo os gatos geriátricos mais afetados (Lees, 1984; Lekcharoensuk, Osborne & Lulich, 2001; Chew et al., 2011). Quando ocorre em gatos adultos jovens é geralmente secundária a cateterização uretral, uretostomia perineal, ou, mais raramente, defeitos anatómicos congênitos (Sykes & Westropp, 2014). Em gatos idosos, as ITUs estão usualmente associadas a diabetes *mellitus*, hipertiroidismo e/ou DRC (Bailiff et al., 2006; Mayer-Roenne, Goldstein & Erb, 2007; Bailiff et al., 2008). Na espécie felina outros fatores que parecem predispor à ocorrência de ITU são a raça (gatos siameses, persa e abissínios), sexo feminino, idade avançada e baixa condição corporal (Lekcharoensuk et al., 2001; Bailiff et al., 2006; Bailiff et al., 2008; Chew et al., 2011; DiBartola & Westropp, 2014).

### 2.1.3 – Etiologia

Independentemente da espécie animal as ITUs de origem bacteriana são as mais comuns (Çetin, Sentürk, Kocabiyik, Temizel & Özel, 2003; Seguin et al., 2003; Bartges, 2004; Sykes & Westropp, 2014), sendo *Escherichia coli* o organismo uropatogénico mais frequentemente isolado (Forrester, Troy, Dalton, Huffman & Holtzman, 1999; Norris et al., 2000; Ling et al., 2001; Cohn et al., 2003; Johnson, Kaster, Kuskowski & Ling, 2003; Bailiff et al., 2006; Stegemann et al., 2006; Litster, Moss, Honnery, Rees & Trott, 2007; Bailiff et al., 2008; Pomba et al., 2009b; Litster, Thompson, Moss & Trott, 2011; Marques et al., 2016).

Na espécie canina, depois de *E. coli*, os cocos Gram-positivos como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. constituem o grupo de organismos mais isolados, sendo também encontrados *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Pasteurella* spp., *Mycoplasma* spp., *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. (Ling et al., 2001; Marques et al., 2016). Nos felídeos, após *E. coli*, as espécies mais significativas são *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Klebsiella* spp. (Bailiff et al., 2006; Litster et al., 2007; Bailiff et al., 2008; Marques et al., 2016). Tanto na espécie canina como felina as ITUs bacterianas são maioritariamente provocadas por único agente, contudo podem ocorrer infeções bacterianas mistas, em que existem duas ou mais espécies causadoras de doença (Ling et al., 2001; Bartges, 2004). Em cães com ITU tem sido isolado *Mycoplasma*, contudo não é clara a sua significância clínica uma vez que este organismo é geralmente identificado em cães que apresentam alterações do trato urinário inferior, nomeadamente neoplasia ou cistolitíase (Sykes & Westropp, 2014).

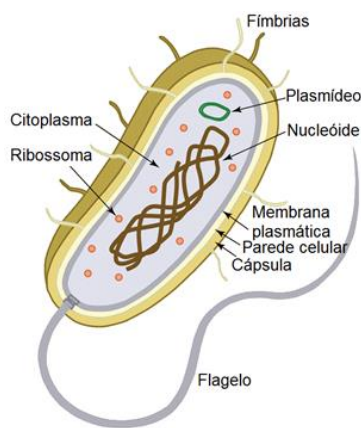
As ITUs fúngicas são bastante raras tanto em cães como em gatos (Lulich & Osborne, 1996; Ling et al., 2001; Pressler, Vaden, Lane, Cowgill & Dye, 2003). Embora os vírus possam ser

causa de doença do trato urinário inferior felino (DTUIF), a prevalência de ITUs virais é desconhecida (Kruger & Osborne, 1990; Kruger et al., 2000).

#### 2.1.3.1 – *E. coli*

*E. coli* foi descrita pela primeira vez em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Escherich, identificando-a inicialmente por *Bacterium coli commune* devido à presença desta bactéria como hóspede natural do trato gastrointestinal de crianças (Escherich, 1988). *E. coli* é um bacilo Gram-negativo da família Enterobacteriaceae, não formador de esporos, anaeróbio facultativo, fermentador da glicose e outros açúcares, sendo na sua maioria móvel devido à presença de um flagelo (Figura 1) (Moxley, 2013).

**Figura 1** – Representação de *E. coli*



(Adaptado de Enger & Ross, 2003)

*E. coli* é um habitante comensal do trato gastrointestinal de humanos e animais (Clermont, Bonacorsi & Bingen, 2000; Siqueira et al., 2009; Bélanger et al., 2011; Bien, Sokolova & Bozko, 2012; Moriel et al., 2012). No entanto, nem todas as estirpes desta bactéria são inofensivas para o hospedeiro, podendo causar doenças tanto em humanos como em outros mamíferos e aves (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Kaper, Nataro & Mobley, 2004). As bactérias comensais raramente provocam doença, exceto em hospedeiros imunodeprimidos ou em situações em que a barreira gastrointestinal se encontre comprometida (Kaper et al., 2004). Existem algumas estirpes que adquirem fatores de virulência que lhes permitem a adaptação a novos nichos, conferindo-lhes assim uma natureza patogénica e a capacidade de causar um largo espectro de doenças (Kaper et al., 2004).

Consoante o local onde provocam doença, as estirpes patogénicas podem ser classificadas em dois grandes grupos: *E. coli* patogénica intestinal (*Intestinal Pathogenic E. coli*, InPEC) e *E. coli* patogénica extra intestinal (*Extra-Intestinal Pathogenic E. coli*, ExPEC) (Bélanger et al., 2011, Moriel et al., 2012). As InPEC, associadas a doenças caracterizadas por diarreia, podem ser classificadas em seis categorias: *E. coli* enteropatogénica (*Enteropathogenic E. coli*, EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (*Enterohemorrhagic E. coli*, EHEC), *E. coli* enterotoxinogénica (*Enterotoxigenic E. coli*, ETEC), *E. coli* enteroagregativa



(*Enteroaggregative E. coli*, EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (*Enteroinvasive E. coli*, EIEC) e *E. coli* aderente-invasiva (*Adherent-Invasive E. coli*, AIEC) (Nataro & Kaper, 1998; Chen & Frankel, 2005; Siqueira et al., 2009; Moriel et al., 2012). As ExPEC, responsáveis por afeções fora do trato gastrointestinal, abrangem *E. coli* uropatogénica (*Uropathogenic E. coli*, UPEC) que provoca ITU, *E. coli* associada a sépsis (*Septicemic E. coli*, SEPEC) e *E. coli* associada a meningite neonatal (*Neonatal Meningitis E. coli*, NEMEC) (Russo & Johnson, 2000; Siqueira et al., 2009; Moriel et al., 2012).

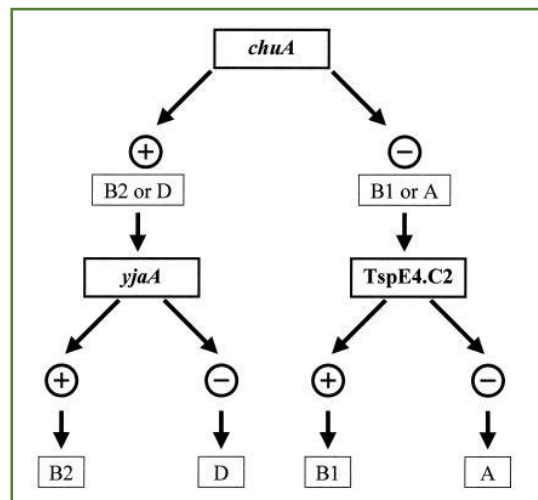
Existe a preocupação das ExPEC e, nomeadamente, as UPEC representarem um risco zoonótico devido à proximidade filogenética entre as diversas estirpes isoladas em humanos e animais de companhia como cães e gatos (Johnson et al., 2001a; Brzuszkiewicz, Gottschalk, Ron, Hacker & Dobrindt, 2009; Pomba et al., 2016). As UPEC colonizam o intestino antes de provocarem ITUs ascendentes (Yamamoto, 2007) pelo que a microbiota fecal de humanos e animais é considerada um reservatório de UPEC (Johnson et al., 2003; Fairbrother & Nadeau, 2006; Bélanger et al., 2011).

Análises filogenéticas de *E. coli* permitiram a sua classificação em quatro grupos principais, nomeadamente A, B1, B2 e D (Ochman, Whittam, Causant & Selander, 1983; Selander, Musser, Causant, Gilmour & Whittam, 1987; Whittam, Ochman & Selander, 1987; Herzer, Inouye, Inouye & Whittam, 1990; Escobar-Páramo et al., 2004).

Clermont et al. (2000) desenvolveram uma técnica de análise filogenética com base em três marcadores genéticos, os genes *chuA* e *yjaA* e o fragmento de ADN TspE4.C2. Com base nos resultados obtidos através da amplificação por PCR destes três marcadores genéticos é possível estabelecer uma árvore dicotómica para classificação filogenética de *E. coli* (Figura 2). De uma forma sucinta, o gene *chuA* encontra-se presente em estirpes de *E. coli* pertencentes ao grupo B2 e D, e ausente nas estirpes classificadas como B1 e A. O gene *yjaA* permite a separação entre os grupos B2 e D, estando presente nas estirpes cuja filogenia é B2. Por fim, o fragmento de ADN TspE4.C2 possibilita a discriminação entre as estirpes A e B1, existindo no grupo filogenético B1.

No que diz respeito à filogenia verifica-se uma distinção entre as ExPEC e as estirpes comensais (Johnson & Stell, 2000). De um modo geral as estirpes de *E. coli* consideradas mais patogénicas e que detêm mais fatores de virulência pertencem maioritariamente ao grupo filogenético B2, e, menos frequentemente, ao grupo D, enquanto que as estirpes comensais são, na maioria, dos grupos filogenéticos A e B1 (Bingen et al., 1998; Boyd & Hartl, 1998; Picard et al., 1999; Johnson & Stell, 2000; Duriez et al., 2001; Johnson, Delavari, Kuskowski & Stell, 2001b; Tenaillon, Skurnik, Picard & Denamur, 2010).

**Figura 2** – Árvore dicotômica para determinação do grupo filogenético das estirpes de *E. coli* de acordo com os resultados da amplificação por PCR dos genes *chuA* e *yjaA* e do fragmento de ADN TspE4.C2



(Adaptado de Clermont et al., 2000)

#### 2.1.4 – Sinais clínicos

Clinicamente, a ITU pode ser sintomática ou assintomática (Bartges, 2004). Nos casos em que existe sintomatologia esta é variável e dependente de vários fatores como a virulência e número de agentes uropatogênicos, presença ou ausência de doenças concomitantes, integridade dos mecanismos de defesa do hospedeiro e local e duração da infecção (Bartges, 2004; Smee, Loyd & Grauer, 2013b).

No caso de ITU inferior os sinais clínicos podem incluir disúria, hematúria, estrangúria e polaquiúria (Bartges, 2004; Sykes & Westropp, 2014). Os gatos podem manifestar periúria, urinando fora da liteira (Sykes & Westropp, 2014). Nas ITUs superiores é provável que os animais exibam dor, hematúria, septicemia ou insuficiência renal (Bartges, 2004). Nos casos em que as ITUs estão associadas a doenças sistêmicas que comprometem os mecanismos de defesa do hospedeiro, os sinais clínicos apresentados são maioritariamente dessas afeções, sendo a ITU relativamente assintomática (Bartges, 2004; Smee et al., 2013b).

Ao exame físico é possível dor à palpação, podendo, em casos mais graves, a bexiga encontrar-se reduzida e com um espessamento da parede (Sykes & Westropp, 2014). Os pacientes com ITUs não complicadas não apresentam grandes alterações ao exame físico. Por sua vez, em ITUs complicadas deve ser feito um exame minucioso do aparelho genitourinário na tentativa de identificar alterações anatómicas que possam predispor à ocorrência de infecção (Smee et al., 2013b).

#### 2.1.5 – Diagnóstico

O diagnóstico desta doença é feito com base na história clínica, achados do exame físico, urianálise e, idealmente, urocultura (Smee et al., 2013b; Sykes & Westropp, 2014).

O método de colheita da urina é fundamental na interpretação dos resultados, sendo a cistocentese a técnica de eleição por minimizar a contaminação da amostra (Weese et al., 2011; Smee et al., 2013b). Nos casos em que a cistocentese não pode ser realizada ou se encontra contraindicada pode recorrer-se à cateterização uretral (Smee et al., 2013b). Embora alguns autores considerem que a colheita por jato livre não é aceitável para urocultura (Weese et al., 2011; Smee et al., 2013b; Olin & Bartges, 2015), estudos recentes sugerem que pode ser utilizada esta técnica, desde que se usem critérios de valoração distintos dos usados nas colheitas por cistocentese e cateterização (Tabela 1) (Sørensen et al., 2016).

**Tabela 1** – Interpretação de uroculturas quantitativas em cães e gatos de acordo com o método de colheita de urina

Método de colheita*	Significativo		Suspeita		Contaminação	
	Cães	Gatos	Cães	Gatos	Cães	Gatos
Cistocintese	≥ 1,000	≥ 1,000	100-1,000	100-1,000	≤ 100	≤ 100
Cateterização	≥ 10,000	≥ 1,000	1,000-10,000	100-1,000	≤ 1,000	≤ 100
Jato livre	≥ 100,000	≥ 10,000	10,000-90,000	1,000-10,000	≤ 10,000	≤ 1,000

\* Valores em UFC/mL

(Adaptado de Pressler & Bartges, 2010)

### 2.1.5.1 – Urianálise

Esta análise constitui um exame de diagnóstico simples, rápido e pouco dispendioso, sendo realizada de forma rotineira (Bartges, 2004). Uma urianálise completa compreende a determinação da densidade urinária (DU), análise bioquímica recorrendo a fitas reagentes e exame microscópico do sedimento urinário (Bartges, 2004; Weese et al., 2011).

Em pacientes com ITU, a DU é variável, podendo encontrar-se aumentada nos animais com doenças concomitantes como diabetes *mellitus* e hiperadrenocorticism (Bartges, 2004; Smee et al., 2013b). As ITUs provocadas por *E. coli* estão geralmente associadas a DU<1.025 (Chew et al., 2011).

As fitas reagentes revelam frequentemente hematúria e proteinúria (Bartges, 2004; Smee et al., 2013b). Em canídeos e felídeos, as fitas de análise química da urina não são específicas nem sensíveis na avaliação de leucócitos e nitritos (Bauer, Rettig & Moritz, 2008; Kvitko-White, Cook, Nabity, Zhang & Lawhon, 2013), sendo frequente falsos negativos em cães e falsos positivos em gatos (Chew et al., 2011). Assim sendo, para identificar piúria e bacteriúria deve ser feito um exame microscópico do sedimento (Bartges, 2004; Smee et al., 2013b). As fitas reagentes também não são válidas para a medição da DU, devendo-se recorrer a um refratómetro para este fim (Dossin, Germain & Braun, 2003).

### 2.1.5.2 – Urocultura

Embora os sinais clínicos e urianálise possam apontar para a presença de ITU, somente a urocultura permite um diagnóstico definitivo (Bartges, 2004; Lulich & Osborne, 2004; Smee et

al., 2013b). A cultura de urina engloba uma análise qualitativa, que possibilita a identificação do microrganismo responsável pela infecção, e uma análise quantitativa, em que é feita a contagem de bactérias em unidades formadoras de colónias (UFC) por mL de urina (Bartges, 2004). A análise qualitativa além de permitir a identificação do agente responsável pela infecção, facilita, igualmente, na diferenciação entre ITU recorrente provocada por recidivas ou reinfeções (Sykes & Westropp, 2014). A análise quantitativa é fundamental na distinção entre verdadeira infecção e contaminação (Tabela 1).

A colheita de urina deve ser sempre realizada antes de ser instituída qualquer terapêutica etiológica, no entanto, nos casos que a antibioterapia foi iniciada, esta deverá ser descontinuada três a cinco dias antes da colheita de modo a minimizar a inibição do crescimento bacteriano (Bartges, 2004; Smee et al., 2013b). No caso de infeções por bactérias resistentes ao antibiótico em uso não é necessário descontinuar a antibioterapia podendo realizar-se colheita de urina e cultura.

### **2.1.5.3 – Teste de Suscetibilidade a Antibióticos (TSA)**

Idealmente, a escolha do antibiótico a utilizar como tratamento deve residir nos resultados obtidos no TSA (Bartges, 2004; Smee et al., 2013b). Os métodos mais frequentemente utilizados são o da difusão em disco de Kirby-Bauer e o da determinação da concentração mínima inibitória (CMI), os quais devem ser realizados de acordo com normas padrão, como por exemplo as publicadas pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) ou pelo EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (Weese et al., 2011). O método da difusão em disco utiliza placas de Mueller Hinton Agar (MHA) inoculadas com uma suspensão do agente causador de ITU, previamente isolado, nas quais são colocados discos impregnados de antibiótico. As placas vão a incubar a 37°C durante 18 a 24 horas, período após o qual é estimada a suscetibilidade dos microrganismos através da medição do halo de inibição de crescimento bacteriano em torno de cada disco. Este halo de inibição é interpretado com base em normas padronizadas, possibilitando classificar o agente patogénico como clinicamente resistente, suscetível ou intermédio (Bartges, 2004; Smee et al., 2013b).

O método da CMI permite determinar qual a menor concentração de antibiótico capaz de inibir completamente o crescimento do agente patogénico isolado. Para este efeito é produzida uma suspensão bacteriana a partir da cultura inicial do agente a qual é posteriormente inoculada e incubada em placas de 96 poços contendo diluições seriadas de antibióticos. Após o período de incubação faz-se a leitura dos resultados macroscopicamente, classificando o agente como resistente, suscetível ou intermédio (Bartges, 2004; Smee et al., 2013b).

Se o agente for considerado suscetível indica que existe uma elevada probabilidade de sucesso terapêutico (80%) com o antibiótico escolhido. No caso de ser intermédio significa que existe hipótese de sucesso terapêutico através de alterações na dosagem normal. Por

fim, se o agente for resistente é provável que não ocorra sucesso terapêutico com o antibiótico selecionado (Smee et al., 2013b).

### 2.1.6 – Tratamento

O tratamento de ITU encontra-se dependente de vários fatores, nomeadamente, a classificação da ITU, o local da infecção e a presença de doenças concomitantes (Smee et al., 2013b). De uma forma geral passa pela resolução das doenças concomitantes ou fatores predisponentes e antibioterapia (Sykes & Westropp, 2014). A escolha do antibiótico a utilizar deve, como já foi dito anteriormente, basear-se nos resultados do TSA, porém, deverá também ter em consideração a farmacocinética, facilidade de administração, possíveis efeitos adversos e custos associados (Smee et al., 2013b). O uso inadequado dos antibióticos pode levar ao aparecimento de organismos resistentes, causando repercussões tanto em saúde pública como na saúde animal, pelo que a escolha do antibiótico e o cálculo da dose a administrar assume uma importância extrema (Morley et al., 2005). Na tabela 2 está representada de forma sucinta a abordagem terapêutica a ITU.

**Tabela 2** – Abordagem terapêutica em cães e gatos com ITU

<b>Tipo de Infecção</b>	<b>Opções terapêuticas iniciais</b>
<b>ITU não complicada</b>	Amoxicilina, sulfamida-trimetoprim
<b>ITU complicada</b>	Baseada em urocultura e TSA, considerando inicialmente amoxicilina e sulfamida-trimetoprim
<b>Bacteriúria subclínica</b>	Antibioterapia não recomendada a menos que existam riscos de infecção ascendente. Nesse caso tratar como ITU complicada
<b>Pielonefrite</b>	Iniciar com fluoroquinolona, basear tratamento em urocultura e TSA

(Adaptado de Pressler & Bartges, 2010)

#### 2.1.6.1 – ITUs não complicadas

Na maioria dos casos de ITU simples e por forma a aliviar o desconforto do animal, poderá ser instituída uma antibioterapia empírica enquanto se aguarda pelos resultados da urocultura e do TSA (Weese et al., 2011; Sykes & Westropp, 2014).

Na maioria das situações, a amoxicilina (11-15mg/kg PO q8h) e a associação sulfamida-trimetoprim (15 mg/kg PO q12h) constituem boas opções terapêuticas (Weese et al., 2011). Contudo, uma vez que a resistência aos antimicrobianos pode variar geograficamente, estas opções terapêuticas representam apenas orientações, pelo que também se deve sempre levar em conta os dados epidemiológicos da tendência de resistência dos agentes uropatogénicos na área geográfica em que o médico veterinário trabalha. Após os resultados laboratoriais equaciona-se a continuação da antibioterapia iniciada (Weese et al., 2011). Neste sentido, se os resultados revelarem a presença de um agente resistente à terapêutica empírica, mas ocorreu melhoria clínica evidente, a manutenção da antibioterapia inicial é plausível desde que se realize nova urianálise e urocultura, por forma a garantir a resolução da infecção (Weese

et al., 2011). No caso de não existir melhoria clínica, a terapêutica inicial deve ser descontinuada, substituindo-se o antibiótico prescrito por outro novo antibiótico, ao qual a bactéria seja suscetível (Weese et al., 2011). Comumente, as ITUs não complicadas são resolvidas em sete a 14 dias de antibioterapia (Weese et al., 2011).

### 2.1.6.2 – ITUs complicadas

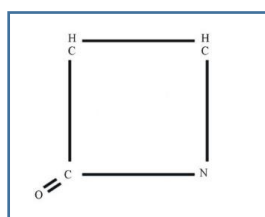
Se a condição clínica do paciente o permitir, o tratamento de ITU complicada apenas deve ser iniciado após os resultados da urocultura e do TSA (Weese et al., 2011). Nos casos em que o tratamento tem de iniciado imediatamente, o antibiótico utilizado deve ser um dos recomendados como antibioterapia empírica em ITUs não complicadas, contudo deverá recorrer-se a uma classe diferente do antibiótico que resultou num insucesso terapêutico anterior (Weese et al., 2011). Os antibióticos selecionados devem ser, preferencialmente, excretados ativamente na urina. Os macrólidos devem ser evitados uma vez que não são, predominantemente, excretados de forma ativa na urina (Weese et al., 2011). Embora não existam evidências científicas, quanto à duração do tratamento, é recomendado um período de quatro semanas (Weese et al., 2011).

## 2.2 – Antibióticos $\beta$ -lactâmicos

### 2.2.1 – Características gerais

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos constituem uma classe de grande importância na prática clínica devido à sua excelente eficácia terapêutica e baixa toxicidade (Wilke, Lovering & Strynadka, 2005; Bush & Macielag, 2010; Drawz & Bonomo, 2010; Llarrull, Testero, Fisher & Mobashery, 2010). Caracterizam-se pela presença do anel  $\beta$ -lactâmico, o qual tem na sua composição três átomos de carbono e um de azoto (Figura 3) (Neu, 1986; Smet et al., 2010).

**Figura 3** – Estrutura básica do anel  $\beta$ -lactâmico

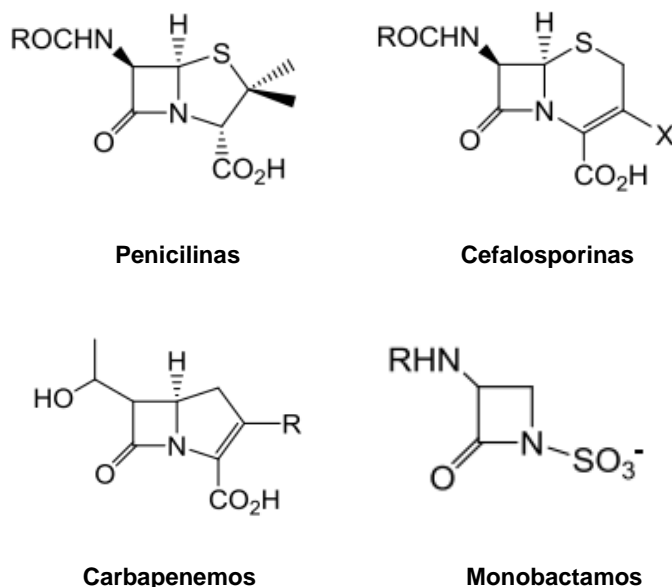


(Adaptado de Saini & Bansal, 2012)

Este anel pode encontrar-se isolado ou conjugado com outro anel, sendo esta característica que permite diferenciar os vários grupos de  $\beta$ -lactâmicos (Donowitz & Mandell, 1988; Samaha-Kfoury & Araj, 2003). A família dos  $\beta$ -lactâmicos é composta por quatro grupos principais: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactams (Figura 4) (Georgopapadakou, 1993; Poole, 2004; Livermore & Woodford, 2006; Suárez & Gudíol, 2009). Nas penicilinas o anel  $\beta$ -lactâmico encontra-se unido a um anel de tiazolidina, nas cefalosporinas está ligado a um anel de dihidrotiazina, nos carbapenemos está combinado com uma cadeia lateral de

hidroxietilo, nos monobactams não existe nenhum anel fundido ao anel principal (Donowitz & Mandell, 1988; Normark & Normark, 2002).

**Figura 4** – Estrutura química dos principais grupos de  $\beta$ -lactâmicos



(Adaptado de Konaklieva, 2014)

### 2.2.2 – Mecanismo de ação

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos interferem com a fase final da síntese da parede celular, inibindo as enzimas bacterianas responsáveis pela síntese do peptidoglicano (Spratt, 1994). O peptidoglicano é um componente essencial da parede celular bacteriana (Nanninga, 1998; Mengin-Lecreulx & Lemaitre, 2005) sendo responsável pela determinação da forma da célula e sua integridade, protegendo-a do meio ambiente e dos fenômenos de osmose (Höltje, 1998; Dramsi, Davison, Magnet & Arthur, 2008). Esta macromolécula é um polímero constituído por cadeias lineares de N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM), estando estas cadeias ligadas através de filamentos laterais de aminoácidos que promovem a união entre os NAM (Scheffers & Pinho, 2005).

Na etapa final da biossíntese do peptidoglicano as ligações covalentes entre NAG e NAM da parede celular são quebradas por autolisinas bacterianas, permitindo a inserção de novos fragmentos de peptidoglicano à parede celular já existente (Spratt, 1994). As transpeptidases e carboxipeptidases são as enzimas que promovem a formação das ligações entre as cadeias peptídicas do novo peptidoglicano e a cadeia de peptidoglicano pré-existente (Spratt, 1994). Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos apresentam a capacidade de se ligar a estas enzimas que, por este motivo, são vulgarmente designadas por proteínas de ligação à penicilina (PLPs) (Suárez & Gudiol, 2009). Esta ligação é possível devido à analogia estrutural existente entre o anel  $\beta$ -lactâmico e a região dos péptidos recém-formados onde se ligariam as PLPs (Tomasz, 1979). Os  $\beta$ -lactâmicos possuem também uma ação sobre as autolisinas bacterianas, conseguindo

ativá-las, levando à destruição enzimática do peptidoglicano (Suarez & Gudiol, 2009). A inibição das PLPs por esta classe de antibióticos, juntamente com a exacerbação das autolisinas bacterianas torna a célula suscetível às forças osmóticas, conduzindo, em última instância, à lise celular (Doyle, Chaloupkaand & Vinter, 1988). Estes antibióticos são mais eficazes em microrganismos com alto índice de multiplicação, devido à elevada taxa de formação de parede celular (Suarez & Gudiol, 2009).

### **2.2.3 – Principais classes**

#### **2.2.3.1 – Penicilinas**

A descoberta da penicilina é atribuída a Alexander Fleming, quando, em 1928, constatou que uma cultura de *Penicillium notatum* produzia uma substância capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* (Nathwani & Wood, 1993; Wright, 1999; Miller, 2002). Os primeiros compostos utilizados na prática médica foram penicilina G e penicilina V, duas penicilinas naturais, com espectro de ação muito limitado, sendo particularmente eficazes em bactérias Gram-positivas, como *Streptococcus*, *Enterococcus* e alguns *Staphylococcus* (Wright, 1999; Miller, 2002). Com o aparecimento de estirpes bacterianas capazes de produzir penicilinasas, enzimas capazes de inativar esta classe de antibióticos, foram desenvolvidas novas penicilinas sintéticas, designadamente, as penicilinas resistentes às penicilinasas (Miller, 2002). As aminopenicilinas, como a ampicilina e amoxicilina, constituíram o primeiro grupo de penicilinas com atividade contra bactérias Gram-negativas, nomeadamente, *E. coli* (Wright, 1999).

#### **2.2.3.2 – Cefalosporinas**

A primeira cefalosporina foi descoberta em 1945 por Giuseppe Brotzu a partir do fungo *Cephalosporinum acremonium* (Asbel & Levison, 2000). Consoante o espectro de ação as cefalosporinas podem ser classificadas em cinco gerações (Tabela 3) (Fernandes, Amador & Prudêncio, 2013).

As cefalosporinas de primeira geração são muito eficazes contra cocos Gram-positivos, excetuando-se *Enterococcus* spp. e *S. aureus* meticilina-resistente (Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA), apresentando uma ação moderada contra bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp. (Fernandes et al., 2013). As cefalosporinas de segunda geração são eficazes contra os organismos incluídos na geração anterior, apresentando, no entanto, maior eficácia em bactérias Gram-negativas (Livermore, 1987). Na geração seguinte o espectro de ação amplia-se relativamente às bactérias Gram-negativas, diminuindo, contudo, a atividade para as bactérias Gram-positivas (Paladino, Sunderlin, Singer, Adelman & Schentag, 2008). As cefalosporinas de quarta geração são utilizadas em espécies resistentes às de terceira geração, como *Enterobacter* e *Citrobacter* (Fernandes et al., 2013). Apresentam, também, maior eficácia em *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* e MRSA, do que a geração anterior (Fritsche, Sader & Jones, 2008). As cefalosporinas de quinta



geração foram desenvolvidas em laboratório especificamente para combater bactérias resistentes, nomeadamente MRSA (Gould et al., 2012). As cefamicinas, como a cefoxitina, são obtidas a partir da bactéria *Streptomyces* não sendo consideradas cefalosporinas, no entanto, devido às suas semelhanças quanto a estrutura e espectro de ação são geralmente agrupadas nesta classe (Fernandes et al., 2013).

**Tabela 3** – Classificação das cefalosporinas em várias gerações de acordo com a sua atividade antimicrobiana

Primeira geração	Segunda geração	Terceira geração	Quarta geração	Quinta geração
Cefalotina	Cefamandol	Cefotaxima	Cefepima	Ceftobiprole
Cefapirina	Cefuroxima	Ceftizoxima	Cefpiroma	Ceftarolina
Cefazolina	Cefonicida	Ceftriaxona		
Cefalexina	Ceforanida	Ceftazidima		
Cefradina	Cefoxitina*	Cefoperazona		
Cefadroxila	Cefmetazol*	Cefixima		
	Cefminox*	Ceftibuteno		
	Cefotetan*	Cefdinir		

\*Apesar de serem cefamicinas, são geralmente incluídas nas cefalosporinas de segunda geração.

(Adaptado de Fernandes et al., 2013)

### 2.2.3.3 – Carbapenemos

De todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são os carbapenemos que possuem maior espectro de ação, sendo também os que apresentam maior estabilidade às  $\beta$ -lactamases (Bush, Jacoby & Medeiros, 1995; Essack, 2001). O Imipenem e o meropenem apresentam boa atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e anaeróbias (Turner, 2008).

### 2.2.3.4 – Monobactams

Os monobactams são antibióticos que exibem baixa atividade antimicrobiana, estando a sua ação direcionada para bactérias Gram-negativas (Thompson, 1987). A utilização destes compostos assume alguma importância devido à sua boa estabilidade às  $\beta$ -lactamases (Saxon, Hassner, Swabb, Wheeler & Adkinson, 1984). O único composto deste grupo utilizado clinicamente é o aztreonam (Thompson, 1987; Essack, 2001; Bush & Macielag, 2010).

### 2.2.3.5 – Inibidores das $\beta$ -lactamases

As  $\beta$ -lactamases são enzimas bacterianas capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico, inativando-o, comprometendo, deste modo, a ação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Majiduddin, Materon & Palzkill, 2002). Os inibidores das  $\beta$ -lactamases são estruturalmente semelhantes às penicilinas, apresentando, no entanto, uma cadeia lateral modificada, que lhes permite ligar irreversivelmente às  $\beta$ -lactamases, inativando-as (Adam, 2002). Estes compostos demonstram fraca atividade antibacteriana, contudo, devido à sua capacidade de inibir as  $\beta$ -lactamases, quando associados a outros antibióticos possibilitam a ação desses mesmos antibióticos (Moosdeen, Williams & Yamabe, 1988; Adam, 2002). Os inibidores das  $\beta$ -

lactamases com maior importância clínica são o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (Bush, 1988; Essack, 2001; Adam, 2002). O ácido clavulânico, isolado em 1976 a partir da bactéria *Streptomyces clavuligerus*, constituiu o primeiro inibidor das  $\beta$ -lactamases introduzido na prática clínica (Reading & Cole, 1977). O sulbactam e o tazobactam são compostos sintéticos que foram desenvolvidos em 1978 e 1980, respetivamente (English, Retsema, Girard, Lynch & Barth, 1978; Fisher, Belasco, Charnas, Khosla & Knowles, 1980). O ácido clavulânico é geralmente combinado com a amoxicilina, o sulbactam com a ampicilina e o tazobactam com a piperacilina (Lee, Yuen & Kumana, 2003).

#### **2.2.4 – Antibióticos $\beta$ -lactâmicos em medicina veterinária e humana**

Muitos dos antibióticos utilizados em animais de companhia são igualmente empregues em medicina humana (*European Medicines Agency* [EMA], 2015). Com o aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos capazes de comprometer o tratamento de infeções graves no Homem, a *World Health Organization* (WHO) (2012) publicou uma lista de antimicrobianos criticamente importantes (*Critically Important Antimicrobials*, CIA). Segundo a WHO (2012) os antibióticos classificados como CIA devem ser utilizados com prudência, tanto em medicina humana como em medicina veterinária, sendo, em alguns casos, destinados a uso exclusivamente humano.

No que diz respeito aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, a amoxicilina, as cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração, os carbapenemos e os monobactams são classificados como CIA (WHO, 2012). As cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração assumem particular importância, tendo sido classificadas como alta prioridade no que diz respeito ao controlo do risco de resistência bacteriana (WHO, 2012). Os carbapenemos não apresentam equivalente em medicina veterinária, tendo sido recomendado pela WHO (2012) que esta classe de antibióticos seja destinada somente à terapêutica em medicina humana. Considerando o risco de disseminação de resistência bacteriana a antibióticos com elevada importância clínica humana e o respetivo impacto em saúde pública, o médico veterinário deverá ponderar de forma racional quais as melhores medidas a adotar (EMA, 2015).

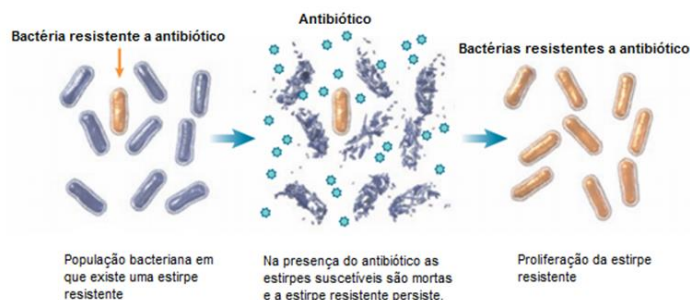
### **2.3 – Problemática da resistência a antibióticos**

O aumento da resistência aos antibióticos representa um problema de saúde pública mundial sendo, segundo alguns autores, comparável ao que se verificou na era pré-antibióticos, visto que o aparecimento de novos recursos terapêuticos não acompanha a evolução dos mecanismos de resistência (Patterson, 2006; Rice, 2006; Sandiumenge et al., 2006; Yim, Wang & Davies, 2006). É uma situação que limita as hipóteses de tratamento das infeções bacterianas, verificando-se uma diminuição da eficácia clínica com aumento nos custos da terapêutica e mortalidade (von Wintersdorff et al., 2016).

Segundo a WHO (2014), o aumento da resistência bacteriana é essencialmente devido à pressão exercida pelos antibióticos na microbiota bacteriana, a qual possibilita uma seleção

preferencial das bactérias resistentes e, conseqüentemente, a disseminação de genes de resistência entre as bactérias (Figura 5).

**Figura 5** – Efeito da pressão seletiva dos antibióticos nas bactérias

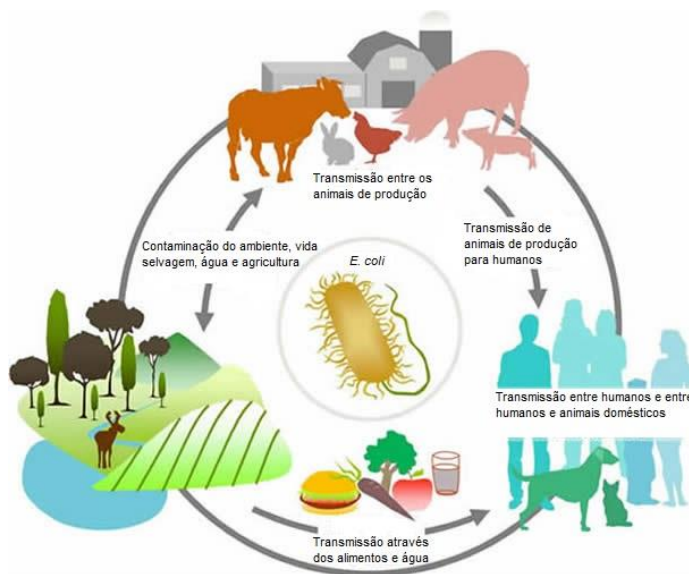


(Adaptado de Muvley & Simor, 2009)

A resistência aos antibióticos é um problema complexo e multifatorial, que implica a existência de mecanismos de resistência, mecanismos de transferência dessa resistência e reservatórios (Guardabassi, Schwarz & Lloyd, 2004).

A utilização abusiva de antibióticos, tanto em medicina humana como animal, assim como o seu uso no sector agropecuário tem promovido o aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos (Witte, 2000; Cabello, 2006; Penders & Stobberingh, 2008; Gould, 2009; Allen et al., 2010; Davies & Davies, 2010; Theuretzbacher, 2011; Andersson & Hughes, 2012; Schmieder & Edwards, 2012; Rodríguez-Rojas, Rodríguez-Beltrán, Couce & Blázquez, 2013; Economou & Gousia, 2015). É plausível que cães e gatos constituam uma fonte de disseminação de bactérias resistentes ao Homem, devido ao uso excessivo de antibióticos nestes animais, aliado ao contacto cada vez mais próximo entre animais e pessoas (Figura 6) (Guardabassi et al., 2004; Pomba et al., 2016).

**Figura 6** – Ciclo de transmissão de *E. coli* resistente a antibióticos



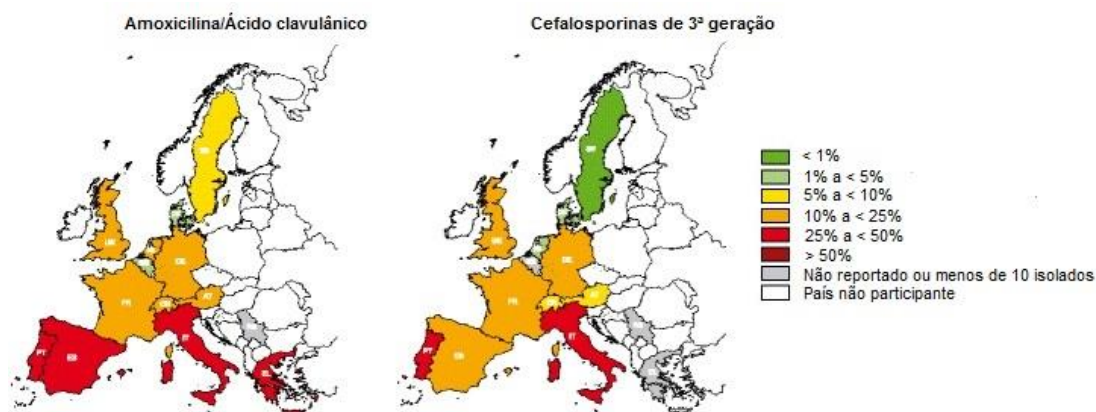
(Adaptado de Reference Laboratory for *Escherichia coli* [ECL], 2004)

### 2.3.1 – Resistência bacteriana aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos em Portugal e na Europa

Segundo os dados, divulgados no relatório anual relativo a 2014 realizado pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), considerando o período de tempo 2011-2014 verificou-se um aumento significativo na resistência de *E. coli* isolada de humanos às aminopenicilinas, em três países Europeus (Bulgária, Lituânia e Luxemburgo) (ECDC, 2015). Relativamente às cefalosporinas de terceira geração foi registado um aumento significativo em 12 países (Alemanha, Bélgica, Bulgária, Eslovénia, França, Grécia, Irlanda, Itália, Noruega, Portugal, República Checa e Suécia). Para a elaboração deste relatório foram consideradas amostras de *E. coli* de proveniência humana presentes em sangue ou líquido cefalorraquidiano (ECDC, 2015). De acordo com este mesmo relatório verifica-se que a resistência antimicrobiana varia geograficamente, apresentando valores mais elevados no Sul e Sudeste da Europa, estando maioritariamente relacionada com as práticas de utilização de antibióticos nos países participantes (ECDC, 2015).

No que diz respeito aos animais de companhia, foi realizado recentemente um estudo multicêntrico a nível Europeu com o propósito de avaliar a evolução e distribuição geográfica da resistência de bactérias isoladas de ITU a diferentes classes de antibióticos (Marques et al., 2016). Relativamente a *E. coli*, no período considerado (2008 a 2013), não foi observada uma variação significativa na resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, havendo inclusive países em que houve um decréscimo na resistência à amoxicilina/ácido clavulânico (Bélgica e Dinamarca) e às cefalosporinas de terceira geração (França e Holanda), excetuam-se a Holanda em que foi verificado um aumento na resistência à amoxicilina/ácido clavulânico (Marques et al., 2016). No estudo de Marques et al. (2016) é igualmente notável a desigualdade de resistência antimicrobiana entre os países do Norte (Dinamarca e Suécia) e do Sul (Espanha, Grécia, Itália e Portugal) (Figura 7), apresentando estes últimos níveis de resistência preocupantes no que diz respeito aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

**Figura 7** – Percentagem (%) de resistência de *E. coli* à amoxicilina/ácido clavulânico e cefalosporinas de 3ª geração por país nos anos 2012-2013



(Adaptado de Marques et al., 2016)

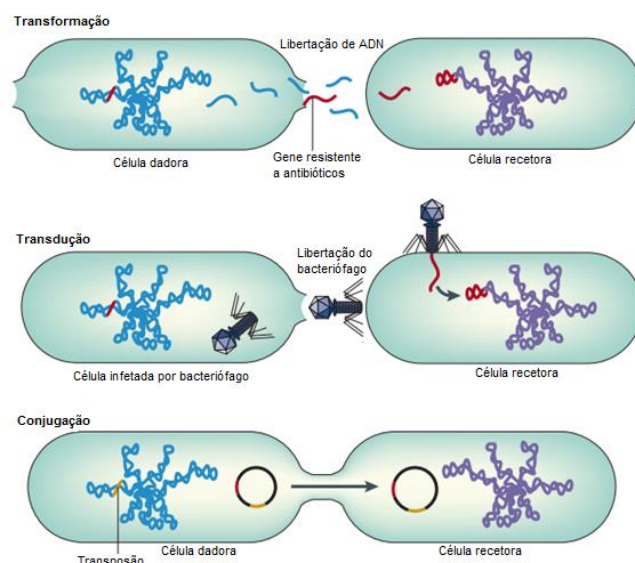
### 2.3.2 – Disseminação de Resistência

No contexto da resistência aos antibióticos, as Enterobacteriaceae podem apresentar resistência intrínseca, exibida naturalmente por uma determinada espécie, ou resistência adquirida, a qual pode resultar de mutação de genes e/ou aquisição de genes de resistência (Aleksun & Levy, 2007; Allen et al., 2010; Cox & Wright, 2013).

A disseminação, entre bactérias, de genes que conferem resistência aos antibióticos pode ocorrer por transmissão vertical, quando os genes que codificam a resistência são transmitidos à descendência aquando da replicação de ADN, ou por transmissão horizontal, quando a bactéria transfere material genético para outra bactéria que não é sua descendente (Frost, Leplae, Summers & Toussaint, 2005; Thomas & Nielsen, 2005; Woodford & Ellington, 2007; Bennett, 2008). A disseminação de genes é facilitada pela existência de elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, transposões e integrões (Cantón, Coque & Baquero, 2003; Mulvey & Simor, 2009). Os integrões são estruturas capazes de adquirir genes, estando por isso associados à disseminação de resistência, contudo têm de estar associados a plasmídeos ou transposões, visto que não são dotados de mobilidade própria (Sabaté et al., 2002; Saladin et al., 2002; Cantón et al., 2003; Bennet, 2008). Os transposões são segmentos de ADN móvel, com capacidade de alterar a sua localização no genoma bacteriano, transportando genes consigo (Kelly, Vespermann & Bolton, 2009). Os plasmídeos são compostos por segmentos de ADN extracromossómico (Carattoli, 2009; Carattoli, 2011; Beceiro, Tomás & Bou, 2012; Carattoli, 2013; El Salabi, Walsh & Chouchani, 2013).

No caso da transmissão horizontal, a transferência pode suceder-se por conjugação, transdução e transformação (Figura 8) (Frost et al., 2005; Thomas & Nielsen, 2005; Tenover, 2006; Bennett, 2008; Džidić, Šušković & Kos, 2008; Hawkey, 2008).

**Figura 8** – Processos de transformação, transdução e conjugação



(Adaptado de Furuya & Lowy, 2006)

Na transformação a bactéria recetora incorpora o ADN existente no meio envolvente proveniente de bactérias dadoras após a sua lise (Chen & Dubnau, 2004; Rolain & Rault, 2005). A transdução é um processo no qual a transferência de genes de resistência é mediada por bacteriófagos os quais funcionam como vetores de ADN (Heuer & Smalla, 2007). Por fim, na conjugação, a troca de material genético ocorre pelo contacto direto entre duas células bacterianas (Džidić et al., 2008). Em *E. coli*, a conjugação é o processo mais representativo na disseminação de resistência (Carattoli, 2011; Beceiro et al., 2012; Carattoli, 2013).

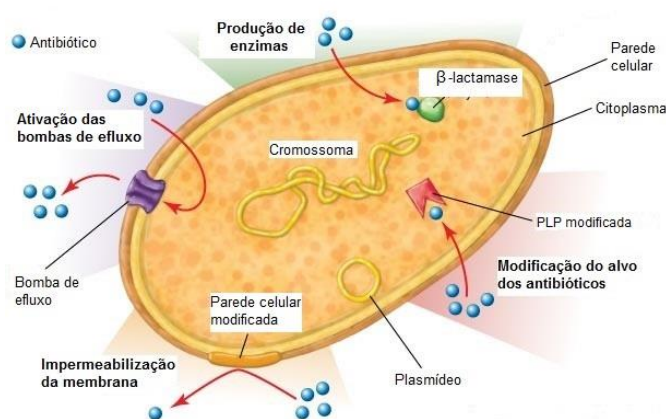
#### **2.3.2.1 – Plasmídeos**

Os plasmídeos são constituídos por segmentos de ADN de cadeia dupla, geralmente circulares, com localização extracromossómica (Carattoli, 2009; Carattoli, 2011; Beceiro et al., 2012; Carattoli, 2013; El Salabi et al., 2013). Estes elementos, para além dos genes essenciais para iniciação e replicação, podem possuir também genes de virulência e genes envolvidos na resistência bacteriana (Diestra et al., 2009). Os plasmídeos têm desempenhado um papel de grande relevância no aparecimento e disseminação de resistência das bactérias aos antibióticos (Carattoli, 2013). Os plasmídeos possibilitam a aquisição e perda de genes, assim como a troca entre diferentes populações bacterianas, contribuindo deste modo para a diversidade genética bacteriana (Johnson et al., 2007; Carattoli, 2011; Beceiro et al., 2012; Carattoli, 2013). Os plasmídeos IncF, largamente disseminados em Enterobacteriaceae, transportam genes responsáveis pela resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e não  $\beta$ -lactâmicos, estando associados ao clone pandémico e virulento de *E. coli* O25b:H4-B2-ST131 (Beceiro et al., 2012). Estas estruturas apresentam, igualmente, capacidade de albergar integrões e transposões (Novais et al., 2006).

#### **2.3.3 – Mecanismos de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos**

A resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos pode decorrer de várias situações: modificação do alvo dos antibióticos, as PLPs, impermeabilização da membrana citoplasmática por alterações nos canais de porina, existência de bombas de efluxo ou inativação enzimática do antibiótico (Figura 9) (Paterson, 2006; Tenover, 2006; Nikaido, 2009).

**Figura 9 – Mecanismos de resistência bacteriana**



(Adaptado de Encyclopædia Britannica, 2009)

### 2.3.3.1 – Modificação do alvo dos antibióticos

Este mecanismo de resistência consiste em alterações nas PLPs, isto é, as bactérias apresentam modificações nestes alvos, nomeadamente, por mutação e hiperexpressão, as quais são responsáveis por dificultar a ligação do antibiótico  $\beta$ -lactâmico à proteína, reduzindo assim a sua atividade (Suárez & Gudiol, 2009).

Embora consista no principal mecanismo de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de algumas bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus pneumoniae*, MRSA e *Enterococcus faecium* (Suárez & Gudiol, 2009), no caso das bactérias Gram-negativas, a resistência não está normalmente associada à modificação das PLPs (Livermore, 1987; Poole, 2004). Uma explicação plausível para este facto é a maior eficácia das  $\beta$ -lactamases e da impermeabilização da membrana citoplasmática na formação de resistência destas bactérias (Georgopapadakou, 1993).

### 2.3.3.2 – Impermeabilização da membrana

Este mecanismo de resistência, como o próprio nome indica, caracteriza-se por uma diminuição da permeabilidade da membrana citoplasmática impedindo assim que o antibiótico alcance o alvo (Poole, 2004; Wilke et al., 2005).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são substâncias hidrofílicas pelo que necessitam de canais específicos, canais de porina, para conseguirem atravessar a membrana externa, constituída por lipopolissacarídeos, e entrarem no espaço periplasmático (Nikaido, 1992). Quando se verifica perda dos canais de porina ou alterações na sua estrutura, a entrada destes antibióticos fica comprometida, impossibilitando a ligação às PLPs (Poole, 2004). Em *E. coli*, esta deficiência é responsável por um aumento da resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Clarke, Hiltz, Musgrave & Forward, 2003). Nesta bactéria quando, através de mutações, se verifica perda de função das porinas OmpF, OmpC e OmpE, pode ocorrer uma diminuição da suscetibilidade aos antibióticos (Martínez-Martínez et al., 2000; Livermore, 2003).



### 2.3.3.3 – Bombas de efluxo

Existem espécies da família Enterobacteriaceae, como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, que apresentam bombas de efluxo com funções fisiológicas sendo, algumas delas, responsáveis também pela expulsão de antibióticos do espaço periplasmático para o meio extracelular (Chevalier et al., 2008; Martinez et al., 2009; Pagès & Amaral, 2009). A existência destas bombas possibilita uma redução da concentração de antibiótico no meio intracelular para níveis em que não existe efeito antibacteriano, conferindo, deste modo, alguma resistência bacteriana (Fernandes et al., 2013).

Os genes que codificam as bombas de efluxo têm sido identificados num número significativo de plasmídeos (Li, Plésiat & Nikaido, 2015). Um estudo em *E. coli* aponta as bombas de efluxo como mecanismo de resistência à cefuroxima (Källman, Fendukly, Karlsson & Kronvall, 2003), contudo, até à data, não tem sido demonstrada a relevância deste mecanismo como forma de resistência desta bactéria aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Fernandes et al., 2013). Este mecanismo é mais eficaz quando, simultaneamente, existe uma alteração a nível das porinas que provoque uma diminuição da permeabilidade (Li et al., 2015).

### 2.3.3.4 – Produção de enzimas – $\beta$ -lactamases

Na família Enterobacteriaceae, a produção de  $\beta$ -lactamases constitui o mecanismo mais relevante de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Livermore, 1995; Poole, 2004; Fisher, Meroueh & Mobashery, 2005; Jacoby & Munoz-Price, 2005; Bebrone et al., 2010; Bush & Jacoby, 2010). Estas enzimas foram identificadas pela primeira vez numa estirpe de *E. coli* por Abraham e Chain (1940), sendo descritas pela sua capacidade de destruir a penicilina.

A ocorrência natural de  $\beta$ -lactamases cromossômicas em muitas das bactérias Gram-negativas sugere que estas enzimas possivelmente já existiriam antes da descoberta dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, provavelmente para lhes conferir vantagem adaptativa quando em competição com outras bactérias (Turner, 2005). Sobre a sua origem, pensa-se que resultem de uma conversão das PLPs por transformação genética, visto existir uma grande homologia entre ambas (Ghuysen, 1991).

As  $\beta$ -lactamases são definidas como enzimas, plasmídicas ou cromossômicas, com capacidade de catalisar a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, inativando-o (Majiduddin et al., 2002).

As  $\beta$ -lactamases plasmídicas são consideradas as principais responsáveis pela disseminação de resistência bacteriana visto poderem ser transferidas entre as várias bactérias Gram-negativas através de conjugação (Samaha-Kfoury & Araj, 2003).

## 2.4 – $\beta$ -lactamases

### 2.4.1 – Classificação das $\beta$ -lactamases

Devido à diversidade de  $\beta$ -lactamases que têm vindo a ser descobertas ao longo dos anos, têm sido propostos vários esquemas de classificação das mesmas (Tabela 4) (Samaha-Kfoury & Araj, 2003).



**Tabela 4** – Evolução da classificação das  $\beta$ -lactamases ao longo dos anos

Ano	Autor	Critério de classificação
1968	Sawai, Mitsuhashi e Yamagishi	Cefalosporinas vs penicilinas como substratos
1973	Richmond e Sykes	Perfil de substrato alargado com sugestão de cinco grupos (Ia-d, II, III, IV e V)
1976	Sykes e Matthew	Distinção das $\beta$ -lactamases plasmídicas de acordo com o ponto isoelétrico
1980	Ambler	Separação das $\beta$ -lactamases em quatro classes moleculares (A-D)
1981	Mitsuhashi e Inoue	Adição da categoria “ $\beta$ -lactamase que hidrolisa cefuroxima”
1989	Bush	Expansão do perfil de substratos, inclusão da reação com ácido etilenodiamino tetra-acético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , EDTA), correlação entre classificação molecular e funcional. Expansão do esquema de Bush e utilização de propriedades bioquímicas, estrutura molecular e sequência nucleotídica. Sugestão de classificação em quatro grupos (1-4) com base no espectro de atividade e outras características funcionais.
1995	Bush et al.	

(Adaptado de Samaha-Kfoury & Araj, 2003)

Atualmente as  $\beta$ -lactamases são classificadas com base em dois esquemas gerais (Paterson & Bonomo, 2005): a classificação molecular de Ambler (1980) e a classificação funcional de Bush et al. (1995). Mais recentemente, Bush e Jacoby (2010) realizaram uma atualização a este último esquema de classificação funcional (Tabela 5).

Ambler (1980) classifica as  $\beta$ -lactamases em quatro grandes classes (A, B, C e D) de acordo com a sua sequência de aminoácidos. As classes A, C e D incluem as enzimas que possuem serina no centro ativo, enquanto as enzimas da classe B, são consideradas metalo- $\beta$ -lactamases uma vez que apresentam um íon zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ) no centro ativo (Bush & Jacoby, 2010). Bush e Jacoby (2010) classificam as  $\beta$ -lactamases em três grupos: cefalosporinases (grupo 1), serino- $\beta$ -lactamases (grupo 2) e metalo- $\beta$ -lactamases (grupo 3).

Sendo muitas as  $\beta$ -lactamases descobertas até à data, apenas se irá abordar mais detalhadamente as famílias com maior importância para este trabalho por serem as mais frequentemente encontradas em *E. coli*, nomeadamente TEM, SHV, CTX, OXA e AmpC.

**Tabela 5 – Classificação das  $\beta$ -lactamases bacterianas**

Bush-Jacoby (2009)	Ambler	Substratos preferenciais	Inibido por		Enzimas Representativas
			Ácido clavulânico	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	Não	Não	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cefalosporinas	Não	Não	GC1, CMY-37
2 <sup>a</sup>	A	Penicilinas	Sim	Não	PC1
2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> geração	Sim	Não	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de largo espectro, monobactams	Sim	Não	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas	Não	Não	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de largo espectro, monobactams	Não	Não	TEM-50
2c	A	Carbenicilina	Sim	Não	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilina, cefepima	Sim	Não	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variável	Não	OXA-1, OXA 10
2de	D	Cefalosporinas de largo espectro	Variável	Não	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenemos	Variável	Não	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de largo espectro	Sim	Não	CepA
2f	A	Carbapenemos	Variável	Não	KPC-2, IMI-1, SME-1
3 <sup>a</sup>	B (B1)	Carbapenemos	Não	Sim	IMP-1, VIM-1, CerA, IND-1
	B (B3)				L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (B2)	Carbapenemos	Não	Sim	CphA, Sfh-1

(Adaptado de Bush & Jacoby, 2010)

#### 2.4.1.1 – $\beta$ -lactamases TEM

A primeira TEM (TEM-1) foi descoberta em 1965 a partir de uma estirpe de *E. coli* de uma paciente grega de nome Temoneira (Datta & Kontomichalou, 1965). Esta foi a primeira  $\beta$ -lactamase mediada por plasmídeo a ser descrita, facto este que facilitou a sua disseminação para outros géneros da família Enterobacteriaceae (Turner, 2005). A enzima TEM-2 difere da TEM-1 no promotor e no ponto isoelétrico devido a uma única substituição aminoacídica (Gln37Lys), exibindo, no entanto, o mesmo perfil hidrolítico (Jacoby & Medeiros, 1991). Estas enzimas TEM integram-se no grupo 2b da classificação de Bush e Jacoby (2010) apresentando capacidade de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de primeira geração, como a cefalotina e cefaloridina, sendo inibidas pelo ácido clavulânico.

Atualmente já foram descritas mais de 174  $\beta$ -lactamases do tipo TEM as quais derivam que da TEM-1 ou TEM-2 (Pfeifer, Cullik & Witte, 2010). As  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (*Extended-Spectrum Beta-Lactamases*, ESBL) têm origem nestas  $\beta$ -lactamases por mutações em genes que afetam o seu centro ativo aumentando deste modo a capacidade hidrolítica (Paterson & Bonomo, 2005). As ESBL, grupo 2be da classificação de Bush e Jacoby (2010), conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração e aztreonam, sendo inibidas pelo ácido clavulânico (Paterson & Bonomo, 2005).

Durante os anos 90 foram descobertas  $\beta$ -lactamases do tipo TEM resistentes aos inibidores da  $\beta$ -lactamase, como o ácido clavulânico, e, no entanto, suscetíveis as cefalosporinas de largo espectro, não sendo consideradas ESBL (Chaïbi, Sirot, Paul & Labia, 1999). Estas enzimas, designadas por TEM resistente aos inibidores (*Inhibitor Resistent TEM*, IRT) têm sido principalmente encontradas em estirpes urinárias de origem humana (Knox, 1995; Nicolas-Chanoine, 1997; Bonomo & Rice, 1999; Chaïbi et al., 1999). São exemplo de IRT as  $\beta$ -lactamases TEM-30 e TEM-31, designadas IRT-2 e IRT-1, respetivamente, encontrando-se no grupo 2br de Bush e Jacoby (2010).

#### 2.4.1.2 – $\beta$ -lactamases SHV

A nomenclatura desta enzima está relacionada com as suas propriedades bioquímicas - variável sulfidríla (*sulfhydryl variable*, SHV) (Jacoby, 2006). A enzima parental deste grupo, SHV-1, foi inicialmente descrita em *K. pneumoniae* (Smet et al., 2010). A SHV-1 pode encontrar-se localizada no cromossoma em algumas espécies, no entanto, em *E. coli* é geralmente mediada por plasmídeo (Heritage, M'Zali, Gascoyne-Binzi & Hawkey, 1999).

A diversidade de enzimas SHV está igualmente associada às substituições aminoacídicas que provocam mudanças no centro ativo e, conseqüentemente, no tipo de substratos que hidrolisam (Jacoby & Munoz-Price, 2005). Assim como nas  $\beta$ -lactamases TEM, as SHV também estão agrupadas na classificação de Bush e Jacoby (2010) nos grupos 2b, 2be e 2br, consoante os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos que hidrolisam. A maioria das enzimas SHV, à semelhança da família TEM, são ESBL (Paterson & Bonomo, 2005; Gupta, 2007).

### 2.4.1.3 – $\beta$ -lactamases CTX-M

A designação CTX-M deve-se à maior atividade hidrolítica destas enzimas para a cefotaxima relativamente à ceftazidima (Smet et al., 2010), estando o M relacionado com o facto de terem sido identificadas pela primeira vez em Munique (Jacoby, 2006). A CTX-M-1, a primeira enzima deste grupo, foi detetada pela primeira vez na Alemanha em 1989 (Bauernfeind, Grimm & Schweighart, 1990). Julga-se que as CTX-M estão intimamente relacionadas com as  $\beta$ -lactamases existentes no cromossoma de *Kluyvera* spp., apresentando menos de 40% de semelhança com as ESBL do tipo TEM ou SHV (Paterson & Bonomo, 2005; Smet et al., 2010).

De acordo com a sequência de aminoácidos, estas enzimas encontram-se distribuídas em cinco grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (Tabela 6) (Bonnet, 2004; Paterson & Bonomo, 2005; Gupta, 2007). No entanto, devido à inclusão da CTX-M-45, alguns autores classificam estas  $\beta$ -lactamases em seis grupos (Rossolini & Docquier, 2006). As CTX-M são enzimas do tipo ESBL estando por isso incluídas no grupo 2be da classificação de Bush e Jacoby (2010).

**Tabela 6** – Distribuição das  $\beta$ -lactamases CTX-M pelos cinco grupos

Grupo da CTX-M	Reservatório natural provável e gene precursor	Exemplos de CTX-M presentes em Enterobacteriaceae
ESBL do tipo CTX-M-1	<i>K. ascorbata</i> genes <i>kluA1-11</i>	CTX-M-1; CTX-M-3; CTX-M-15 <sup>a</sup> ; CTX-M-23 <sup>a</sup> ; CTX-M-28 <sup>a</sup> ; CTX-M-32 <sup>a</sup> ; CTX-M-54 <sup>a</sup> ; CTX-M-58 <sup>a</sup>
ESBL do tipo CTX-M-2	<i>K. ascorbata</i> genes <i>kluA1-11</i>	CTX-M-2; CTX-M-35 <sup>a</sup> ; CTX-M-42 <sup>a</sup>
ESBL do tipo CTX-M-9	<i>K. georgiana</i> gene <i>kluG1</i>	CTX-M-14; CTX-M-16 <sup>a</sup> ; CTX-M-19 <sup>a</sup> ; CTX-M-27 <sup>a</sup>
ESBL do tipo CTX-M-8	<i>K. georgiana</i> gene <i>kluG1</i>	CTX-M-8; CTX-M-40; CTX-M-63
ESBL do tipo CTX-M-25	<i>K. georgiana</i> gene <i>kluG1</i>	CTX-M-25; CTX-M-26; CTX-M-41

a) CTX-M capazes de conferir resistência à ceftazidima.

(Adaptado de Pfeifer et al., 2010)

Estas enzimas sofreram uma franca expansão a partir de 1995, representando o tipo de ESBL mais encontrado na América do Sul, Ásia, certos países da Europa Oriental e no leste da Europa (Bonnet, 2004). De acordo com estudos recentes, na família Enterobacteriaceae, as enzimas CTX-M têm vindo a substituir outras ESBL, como as TEM e SHV (Coque, Baquero & Cantón, 2008; Angel-Díaz, Ramón-Hernández, Martínez-Martínez, Rodríguez-Baño & Pascual, 2009; Hawkey & Jones, 2009; Bush, 2010; Rodriguez-Villalobos et al., 2011; Belas, Salazar, Gama, Couto & Pomba, 2014). Esta situação pode ser consequência da excecional

disseminação dos genes *bla*<sub>CTX-M</sub> através de plasmídeos (Cantón & Coque, 2006; Cantón et al., 2008; Rogers, Sidjabat & Paterson, 2011; Woodford, Turton & Livermore, 2011). As enzimas CTX-M estão associadas a integrações com genes que codificam  $\beta$ -lactamases de outras famílias, como os genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>OXA</sub> (Pitout, Nordmann, Laupland & Poirel, 2005; Pitout & Laupland, 2008; Rossolini, D'Andrea & Mugnaioli, 2008; Peirano & Pitout, 2010; Pfeifer et al., 2010; Chong, Ito & Kamimura, 2011; D'Andrea, Arena, Pallecchi & Rossolini, 2013; Wellington et al., 2013).

Tem-se verificado a disseminação de uma estirpe de *E. coli* bastante virulenta, o clone O25b:H4-B2-ST131, o qual expressa frequentemente a enzima CTX-M-15 (Peirano & Pitout, 2010; Vimont et al., 2012; Banerjee & Johnson, 2014). Esta estirpe encontra-se descrita no Homem (Nicolas-Chanoine et al., 2008; Pomba et al., 2014), em animais de companhia (Pomba, da Fonseca, Baptista, Correia & Martínez-Martínez, 2009a; Pomba et al., 2014; Timofte, Maciucă, Kemmett, Wattret & Williams, 2014) e no ambiente (Dolejska et al., 2011; Brahmi, Dunyach-Rémy, Touati & Lavigne, 2015).

#### 2.4.1.4 – $\beta$ -lactamases OXA

As  $\beta$ -lactamases OXA apresentam esta denominação devido à capacidade de hidrólise sobre a oxacilina (Jacoby, 2006). Estas enzimas, embora mais predominantemente detetadas em *P. aeruginosa* (Hall, Livermore, Gur, Akova & Akalin, 1993; Poirel, Girlich, Naas & Nordman, 2001; Weldhagen, Poirel & Nordmann, 2003), são também descritas em muitas outras bactérias Gram-negativas, sendo OXA-1 encontrada com alguma frequência em *E. coli* (Livermore, 1995). De acordo com a sua capacidade hidrolítica, as enzimas OXA podem ser inseridas nos diferentes subgrupos da classificação de Bush e Jacoby (2010). O subgrupo 2d é formado pelas enzimas capazes de degradar a cloxacilina e oxacilina, do qual fazem parte OXA-1 e OXA-10. No subgrupo 2de encontram-se as  $\beta$ -lactamases OXA que para além da cloxacilina e oxacilina, têm capacidade de hidrolisar cefalosporinas de largo espectro. À semelhança do que se verifica com as famílias TEM e SHV, as ESBL do tipo OXA têm origem em enzimas parentais, que ao apresentarem substituições aminoacídicas aumentam a sua capacidade de hidrólise (Smet et al., 2010). As enzimas deste subgrupo derivam, na sua maioria, da OXA-10 (Bush & Jacoby, 2010). Por fim, no grupo 2df, encontram-se as enzimas OXA capazes de degradar os carbapenemos. São observadas, usualmente, em *Acinetobacter baumannii*, sendo codificadas em genes localizados no cromossoma (Walther-Rasmussen & Høiby, 2006), contudo as OXA mediadas por plasmídeos, OXA-23 e OXA-48, já foram detetadas em Enterobacteriaceae (Bush et al., 1995; Poirel, Héritier, Tolün & Nordmann, 2004). Na sua maioria, as  $\beta$ -lactamases OXA, mostram alguma resistência à inibição pelo ácido clavulânico (Jacoby & Muñoz-Price, 2005).

### 2.4.1.5 – $\beta$ -Lactamases AmpC

As  $\beta$ -lactamases AmpC são enzimas que se encontram presentes em vários géneros da família Enterobacteriaceae, como *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., apresentando, geralmente, localização cromossómica (Philippon, Arlet & Jacoby, 2002; Jacoby, 2009). Em *E. coli*, o gene que codifica para a AmpC encontra-se fracamente expresso, verificando-se, conseqüentemente, uma baixa produção da enzima (Honoré, Nicolas & Cole, 1986; Pérez-Pérez & Hanson, 2002; Jacoby, 2009). Contudo, nesta espécie, existem AmpC mediadas por plasmídeo (*Plasmid-Mediated AmpC*, *pAmpC*) capazes de conferir resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Jacoby & Munoz-Price, 2005; Smet et al., 2010). Estas enzimas, descritas mundialmente, parecem ter origem em genes AmpC cromossómicos de outros membros da família Enterobacteriaceae (Tabela 7) (Pérez-Pérez & Hanson, 2002).

**Tabela 7** – Origem das  $\beta$ -lactamases AmpC em Enterobacteriaceae

$\beta$ -lactamase AmpC	Origem	País e ano	Espécie em que foi isolada	Referência
<b>MIR-1</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>	EUA, 1988	<i>K. pneumoniae</i>	Jacoby e Tran (1999)
<b>CMY-2</b>	<i>Citrobacter freundii</i>	Grécia, 1990	<i>K. pneumoniae</i>	Bauernfeind, Stemmlinger, Jungwirth e Giamarellou (1996)
<b>MOX-1</b>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Japão, 1991	<i>K. pneumoniae</i>	Horii et al. (1993)
<b>FOX-1</b>	<i>Aeromonas caviae</i>	Argentina, 1989	<i>K. pneumoniae</i>	Gonzalez Leiza et al. (1994)
<b>DHA-1</b>	<i>Morganella morganii</i>	Arábia Saudita, 1992	<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis	Gaillot, Clément, Simonet e Philippon (1997)
<b>ACC-1</b>	<i>Hafnia alvei</i>	Alemanha, 1997	<i>K. pneumoniae</i>	Bauernfeind, Schneider, Jungwirth, Sahly e Ullmann (1999)

(Adaptado de Pfeifer et al., 2010)

A primeira AmpC mediada por plasmídeo, CMY-1, foi descrita em 1989 (Bauernfeind, Chong & Schweighart, 1989), ao qual se seguiram MIR-1 e CMY-2 (Papanicolaou, Medeiros & Jacoby, 1990). Até hoje já foram descritos outros tipos de AmpC, tais como MOX, FOX, DHA e ACC (Tabela 7).

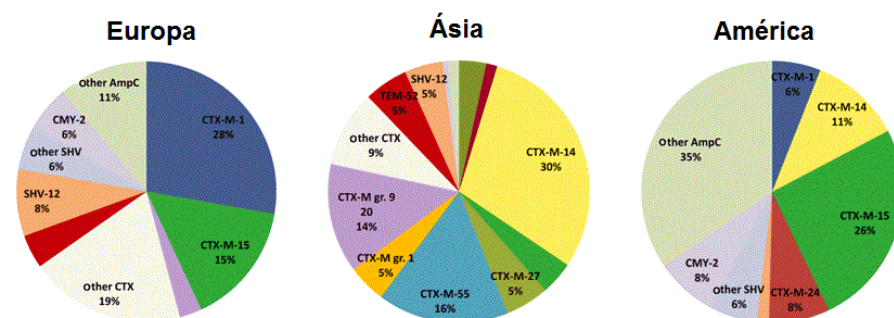
A nomenclatura das AmpC está relacionada com diversos critérios, nomeadamente: a resistência a determinados antibióticos, cefamicina no caso de CMY (*cephamycin*), cefoxitina em FOX (*cefoxitine*) e moxalactam em MOX (*moxalactam*); o local onde foram descobertas, Hospital Dhahran na Arábia Saudita, DHA (Dhahran); Hospital Miriam nos Estados Unidos da América (EUA), MIR (Miriam); o tipo de enzima, no caso de ACC, Classe C da classificação de Ambler (*Ambler Class C*) (Jacoby, 2006; Philippon et al., 2002). Em *E. coli*, a CMY-2 é a  $\beta$ -lactamase AmpC mais frequentemente detetada tanto em humanos como animais de companhia e de produção (Ewers, Bethe, Semmler, Guenther & Wieler, 2012).

As AmpC são mais ativas nas cefalosporinas do que nas benzilpenicilinas, sendo geralmente resistentes ao ácido clavulânico (Jacoby & Munoz-Price, 2005; Bush & Jacoby, 2010).

### 2.4.2 – ESBL e AmpC em animais de companhia

A primeira ESBL descrita em animais de companhia foi identificada em 1986 no Japão, a partir de uma estirpe de *E. coli* isolada a partir das fezes de um cão utilizado para estudos farmacocinéticos de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Tratava-se de uma enzima do tipo CTX-M designada por FEC-1 (Fujisawa *E. Coli*-1) (Matsumoto, Ikeda, Kamimura, Yokota & Mine, 1988). Desde essa altura, muitos outros casos de ESBL isoladas em animais de companhia têm vindo a ser descritos (Tabela 8). Em 1998 foi descoberta em Espanha a primeira ESBL clínica, uma  $\beta$ -lactamase do tipo SHV-12 produzida por uma estirpe de *E. coli* isolada de um cão com ITU recorrente (Teshager et al., 2000). A partir do ano 2000, à semelhança do que se verificou em medicina humana, parece ter existido um aumento significativo de ESBL do tipo CTX-M em animais de companhia (Carattoli, 2008; Smet et al., 2010). A primeira estirpe de *E. coli* produtora de CTX-M-1 foi reportada em Portugal, a partir de uma amostra fecal de um cão saudável (Costa et al., 2004). Todavia, foi em Itália que num estudo que utilizava amostras de animais de companhia saudáveis e doentes se verificou uma emergência significativa de *E. coli* produtoras de CTX-M-1 (Carattoli et al., 2005). Relativamente às ESBL do tipo CTX-M-15, importante referir o aparecimento e propagação a nível mundial do clone O25b:H4-B2-ST131 (Ewers et al., 2010). Este clone foi identificado em animais de companhia, pela primeira vez, em Portugal, num estudo que incluía 61 amostras de *E. coli* isoladas de cães (n=41) e gatos (n=20) com ITU (Pomba et al., 2009a). De acordo com a localização geográfica verifica-se uma variação no que diz respeito às ESBL e AmpC detetadas em animais de companhia (Figura 10) (Ewers et al., 2012). No continente Europeu, considerando vários estudos de animais de companhia saudáveis e doentes (Tabela 8), as ESBL mais frequentemente produzidas por *E. coli* são CTX-M do grupo 1, nomeadamente CTX-M-1 e CTX-M-15. Por outro lado, as CMY-2 são as  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC mais frequentemente descritas na Europa (Ewers et al., 2012). Em Portugal os estudos relacionados com a produção de  $\beta$ -lactamases por *E. coli* em animais de companhia são escassos, sendo na sua maioria relativos à microbiota fecal de animais saudáveis (Costa et al., 2004; Costa et al., 2008; Belas et al., 2014). No estudo de Costa et al. (2004) foram caracterizadas quatro estirpes de *E. coli* produtoras de ESBL, sendo três destas do tipo TEM, nomeadamente TEM-52, existindo apenas uma  $\beta$ -lactamase do tipo CTX-M, mais precisamente CTX-M-1. Por sua vez, num trabalho de Belas et al. (2014), todas as ESBL caracterizadas eram do tipo CTX-M, sendo CTX-M-32 e CTX-M-15 as enzimas mais frequentemente detetadas. Neste mesmo estudo, também foram encontradas  $\beta$ -lactamases AmpC, sendo, na sua maioria, CMY-2.

**Figura 10** – Distribuição geográfica dos vários tipos de ESBL e AmpC produzidos por *E. coli* em animais de companhia



(Adaptado de Ewers et al., 2012)

**Tabela 8** – Presença de *E. coli* produtoras de ESBL e AmpC em cães e gatos por ordem cronológica de data de publicação

Espécie animal	Doentes/ Saudáveis	Percentagem (%) de amostras em que foram detetadas β-lactamases (nº total de amostras)	Prercentagem (%) de cada tipo de β-lactamase detetada	País	Ano de isolamento	Referência
Canina	Saudável	NE	FEC-1 (=Tipo CTX-M)	Japão	1986	Matsumoto et al. (1988)
Canina	ITU recorrente	100% (1/1 Estudo de caso)	SHV-12	Espanha	1998	Teshager et al. (2000)
Canina	ITU	15,3% (72)	SHV (27,3%); AmpC (45,8%); SHV+AmpC (9,1%)	Portugal	NE	Féria, Correia, Gonçalves e Caniça (2002)
Canina	ITU, IF	100% (22)	CMY-2(100%)	EUA	NE	Sanchez et al. (2002)
Canina	Saudáveis	10,3% (39)	TEM-52 (75%); CTX-M-1 (25%);	Portugal	2003	Costa et al., (2004)
Canina	Saudáveis	8,2% (49)	CTX-M-1 (75%); CMY-2 (25%)	Itália	2001-2003	Carattoli et al. (2005)
Canina	NE	7.3% (177)	CTX-M-1 (61.5%); SHV-12 (15.4%); CTX-M-1+SHV-12 (15.4%); CMY-2 (7.7%)	Itália	2001-2003	Carattoli et al. (2005)
Felina	NE	3.5% (57)	CTX-M-1 (100%)	Itália	2001-2003	Carattoli et al. (2005)
Canina	ITU, IF	100% (11/11 Pré-seleção)	CMY-7 (100%)	Austrália	1999-2001	Sidjabat et al., (2006)
Canina	IF (2); ITU (1)	100% (3/3 Pré-seleção)	Tipo CTX-M (100%)	Reino Unido	2007	Steen e Webb (2007)
Canina	Saudáveis	2,6% (78)	CTX-M-1+OXA-30 (100%)	Portugal	2003	Costa et al., (2008)
Canina	Saudáveis	1,1% (188)	CMY-2 (100%)	Canadá	2002	Murphy et al. (2009)
Canina e Felina	ITU	4.9% (61)	CTX-M-15 (33.3%); CMY-2 (66.7%)	Portugal	2004-2006	Pomba et al., (2009a)
Canina	ITU; IF; ITG	10,7% (84)	CTX-M-15 (88.9%); SHV-12 (11.1%)	Europa	2008-2009	Ewers et al., (2010)
Canina e Felina	ITU	7,3% (150)	SHV-12 (9.1%); CTX-M-14 (9.1%); CTX-M-15 (81.8%)	EUA	2004-2007	O'Keefe, Hutton, Schifferli e Rankin (2010)
Canina	Saudáveis	5,8% (86)	SHV-12 (100%)	Japão	NE	Harada, Morimoto, Kataoka e Takahashi (2011)
Canina e Felina	ITR; ITU	0,9% (228)	CTX-M-1 (50%); CTX-M-15 (50%)	Alemanha	2004-2006	Schink, Kadlec e Schwarz (2011)
Canina	ITG	100% (3/3 Estudo de caso)	CTX-M-15 (33.3%); CTX-M grupo 9 (66.7%)	Reino Unido	NE	Timofte, Dandrieux, Wattret, Fick e Williams (2011)

IF – Infecção de Feridas; ITG – Infecção do Trato Gastrointestinal; ITR – Infecção do Trato Respiratório; ITU – Infecção Trato do Urinário; NE – Não Especificado.

(Adaptado de Ewers et al., 2012)



### 3 – Objetivos

O presente estudo foi desenvolvido no LRAB da FMV-ULisboa durante os meses de maio a outubro de 2015. O principal objetivo deste projeto foi avaliar a evolução da resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, em particular à amoxicilina/ácido clavulânico e às cefalosporinas de terceira geração, da bactéria *E. coli*, presente em animais de companhia com ITU, num período de 16 anos (1999-2014).

No sentido de alcançar o objetivo proposto, o trabalho foi dividido em duas etapas principais: numa primeira fase, a realização do TSA e a classificação filogenética de todas as bactérias em estudo. A partir dos resultados do antibiograma, efetuar um estudo mais aprofundado das *E. coli* que demonstraram perfil de resistência à ampicilina, à amoxicilina/ácido clavulânico, às cefamicinas e às cefalosporinas de terceira geração, com caracterização dos mecanismos de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, nomeadamente a produção de  $\beta$ -lactamases TEM, SHV, OXA, CTX-M e AmpC.

### 4 – Materiais e métodos

#### 4.1 – Caracterização da amostra

Este estudo utilizou *E. coli* isoladas de animais de companhia, cão e gato, com ITU, as quais foram reunidas ao longo de um período de 16 anos, de 1999 a 2014. As bactérias utilizadas neste estudo eram provenientes de amostras urinárias recolhidas no Hospital Escolar da FMV-ULisboa e de Hospitais e Clínicas da região de Lisboa. As bactérias encontravam-se conservadas num meio de enriquecimento de caldo de cérebro e coração (*Brain-Heart Infusion Broth*, BHIB) (Biokar Diagnostics, França) com glicerol a 20% a uma temperatura de -20°C.

#### 4.2 – Isolamento bacteriano

As bactérias foram semeadas por esgotamento por estria de 1  $\mu$ L de suspensão bacteriana em MacConkey Agar (MAC) (Biokar Diagnostics, França), sendo posteriormente incubadas a 37°C durante um período de 24h. Sendo MAC um meio seletivo e diferencial para bactérias Gram-negativas, o crescimento de colónias rosa forte com halo de precipitação dos sais biliares (Figura 11) permite uma identificação presuntiva da bactéria em causa, no entanto, a sua confirmação foi posteriormente feita por PCR. No presente projeto foram utilizadas bactérias conservadas em congelação, pelo que, pontualmente, não foi possível obter bactérias em MAC. Nesses casos, num tubo de ensaio com tampa, foi realizada uma suspensão de 100  $\mu$ L de bactéria em 5 mL de BHIB. Os tubos foram colocados num agitador de temperatura e velocidade constante durante 24h, sendo efetuada uma sementeira por esgotamento ao fim deste tempo.

A partir da placa de MAC foi repicada uma colónia para uma placa contendo o meio MHA (Biokar Diagnostics, França), sendo esta incubada durante 24h a uma temperatura de 37°C.

Findo este período, as colónias obtidas foram utilizadas para efetuar a extração de ADN e para a realização de TSA.

**Figura 11** – Aspeto das colónias de *E. coli* em MAC



(Fotografia original)

### 4.3 – Extração de ADN

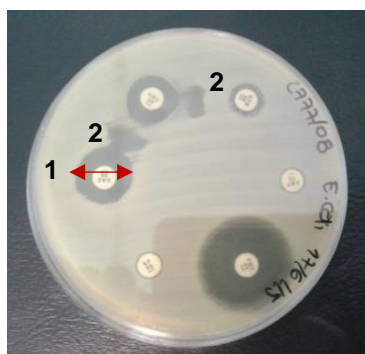
O protocolo utilizado neste procedimento foi baseado na extração de ADN em bactérias Gram-negativas pelo método de fervura utilizado no LRAB. Resumidamente, fez-se uma suspensão da cultura da bactéria em estudo em 100 µL de água destilada estéril e lise através do calor durante 15 minutos a 100°C. O ADN sobrenadante obtido por centrifugação foi conservado à temperatura de -20°C para os estudos posteriores.

### 4.4 – TSA

O estudo dos padrões de suscetibilidade de cada amostra foi efetuado pelo método de difusão de disco, de acordo com as diretivas do CLSI (CLSI, 2013; CLSI, 2015). Com o auxílio de uma zaragatoa repicou-se uma colónia isolada da bactéria em estudo sendo esta suspensa num tubo de ensaio contendo 5 mL de NaCl 0,85% de forma a obter uma turbidez de 0,5 na escala de *Macfarland*. Após a homogeneização da suspensão, com uma zaragatoa humedecida, efetuou-se uma sementeira em tapete numa placa de MHA tendo o cuidado de cobrir toda a placa. De seguida colocaram-se os discos (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) impregnados de antibiótico com um dispensador (Oxoid, Hampshire, Reino Unido). As placas foram incubadas a 37°C durante 18h, período após o qual se fez a medição e interpretação do diâmetro dos halos de inibição de acordo com os critérios clínicos do CLSI (CLSI, 2013; CLSI, 2015) (Figura 12). A estirpe *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como estirpe de referência no TSA. No caso dos antibióticos cefotaxima, ceftazidima e amoxicilina/ácido clavulânico, os halos de inibição foram observados cuidadosamente de forma a inferir sobre a possibilidade da bactéria ser produtora de ESBL pela presença de sinergia positiva (Drieux, Brossier, Sougakoff & Jarlier, 2008) (Figura 12).

O perfil de suscetibilidade de cada *E. coli* foi determinado utilizando os seguintes compostos: ampicilina (AMP) 10 µg, amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) 30 µg, cefoxitina (FOX) 30 µg, cefotaxima (CTX) 30 µg, ceftazidima (CAZ) 30 µg e cefovecina (CVN) 30 µg.

**Figura 12** – Medição do diâmetro dos halos de inibição e observação de sinergia positiva pelo método de difusão em disco de Kirby-Bauer



**Legenda:** 1, halo de inibição; 2, sinergia positiva (Fotografia original)

## 4.5 – PCR

Em primeiro lugar, para proceder à confirmação de *E. coli*, e, simultaneamente, fazer a sua classificação quanto à filogenia. No caso das bactérias que demonstraram perfil de resistência, o PCR foi utilizado para deteção de genes que codificam para as  $\beta$ -lactamases TEM, SHV, OXA, CTX e AmpC (MOX, CMY, DHA, ACC, MIR e FOX).

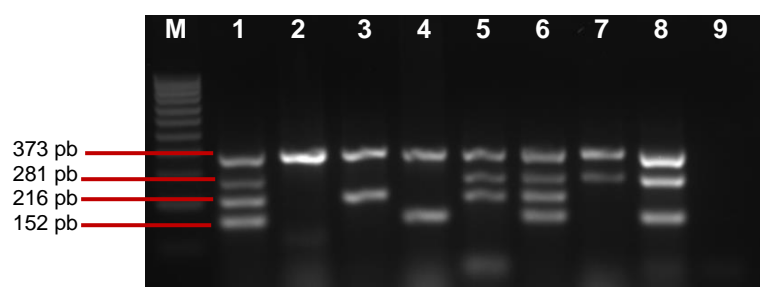
### 4.5.1 – Confirmação da espécie e classificação quanto à filogenia

A identificação da espécie *E. coli* foi obtida através de um multiplex-PCR onde é feita a amplificação do gene *gadA*, o qual é característico desta espécie. Este multiplex-PCR, adaptado do protocolo descrito por Doumith, Day, Hope, Wain e Woodford (2012), permite também a classificação da bactéria quanto ao seu grupo filogenético através da amplificação de outros dois genes, *chuA* e *yjaA* e do fragmento de ADN TspE4.C2 (Figura 13).

O PCR foi realizado com um volume final de 25  $\mu$ L contendo água MiliQ esterilizada, Tampão DreamTaq 1x, 3,25 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM de cada desoxirribonucleotido trifosfato (dNTP), 0,2  $\mu$ M de cada um dos oligonucleótidos iniciadores *chuAF*, *chuAR*, *yjaAF*, *yjaAR*, TSPE4.C2F e TSPE4.C2R, 0,4  $\mu$ M de cada um dos oligonucleótidos iniciadores *gadAF* e *gadAR* (Tabela 9), 1,25U de DreamTaq (Fermentas ThermoScientific, Chicago, EUA) e 1,5  $\mu$ L de ADN. A reação realizada em termociclador (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) compreendeu uma desnaturação inicial a 94°C durante 4 minutos, à qual se seguiram 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), hibridação (30 segundos a 65°C) e extensão (30 segundos a 72°C), acabando com uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

De forma a ser possível uma correta interpretação dos resultados, para cada PCR foi utilizado um controlo positivo, ADN de uma estirpe padrão previamente sequenciada, detentora dos três genes e do fragmento de ADN, e um controlo negativo, onde não existia ADN.

**Figura 13** – Multiplex-PCR para classificação filogenética das estirpes de *E. coli*



**Legenda:** M, marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder V (NZYtech, Lisboa, Portugal); 1, controlo positivo; 2 e 3, Filogrupo A; 4, Filogrupo B1; 5 e 6, Filogrupo B2; 7 e 8, Filogrupo D; 9, controlo negativo (Fotografia original)

**Tabela 9** – Lista de oligonucleótidos iniciadores, com respetivas sequências nucleotídicas, tamanho de produto de PCR e referência, utilizados na técnica de PCR para classificação filogenética das estirpes de *E. coli*

Oligonucleótido	Sequência nucleotídica (5'→3')	Tamanho produto PCR (pb)	Referência
Iniciador			
gadAF	GATGAAATGGCGTTGGCGCAAG	373	Doumith et al. (2012)
gadAR	GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC		
chuaAF	ATGATCATCGCGGCGTGCTG	281	
chuaAR	AAACGCGCTCGCGCCTAAT		
yjaAF	TGTTTCGCGATCTTGAAAGCAAACGT	216	
yjaAR	ACCTGTGACAAACCGCCCTCA		
TSPE4.C2F	GCGGGTGAGACAGAAACGCG	152	
TSPE4.C2R	TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG		

#### 4.5.2 – Detecção de genes que codificam para as $\beta$ -lactamases

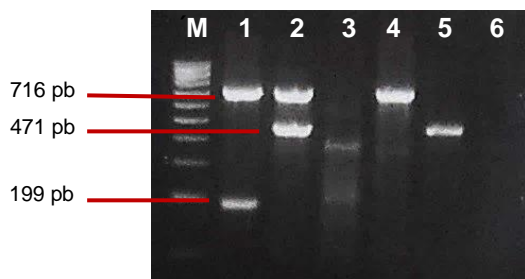
A deteção de genes que codificam para as  $\beta$ -lactamases foi realizada através de PCRs distintos. Todas as estirpes de *E. coli*, com resistência a pelo menos um dos  $\beta$ -lactâmicos testados, foram caracterizadas quanto à presença de  $\beta$ -lactamases do tipo TEM, SHV e OXA. As estirpes com resistência às cefalosporinas de terceira geração foram adicionalmente testadas para a presença de ESBL e AmpC.

##### 4.5.2.1 – Detecção de genes que codificam para as $\beta$ -lactamases do tipo TEM, SHV e OXA

Os genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> foram detetados por um multiplex-PCR adaptado do protocolo de Féria et al. (2002) (Figura 14). O PCR foi realizado com um volume final de 25  $\mu$ L contendo água MiliQ esterilizada, Tampão NZYTaq 1x, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM de cada dNTP, 0,2  $\mu$ M de cada um dos oligonucleótidos iniciadores Bf, Br, Oxa-1f e Oxa-1r, 0,6  $\mu$ M de cada um dos oligonucleótidos iniciadores Shvf e Shvr (Tabela 10), 0,75U de NZYTaq (NZYtech, Lisboa, Portugal) e 1  $\mu$ L de ADN. A reação ocorreu em termociclador e compreendeu uma

desnaturação inicial a 94°C durante 7 minutos, seguida de 30 ciclos de hibridação (5 minutos a 60°C), extensão (1 minuto a 72°C) e desnaturação (1 minuto a 94°C). Seguiu-se uma hibridação (2 minutos a 60°C) acabando com uma extensão final de 5 minutos a 72°C. De forma a ser possível uma correta interpretação dos resultados, para cada PCR foram utilizados dois controlos positivos, ADN de uma estirpe padrão previamente sequenciada, detentora dos genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>OXA-1</sub> e ADN de uma estirpe padrão previamente sequenciada detentora dos genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>, e um controlo negativo, onde não existia ADN.

**Figura 14** – Multiplex-PCR para deteção dos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>OXA-1</sub> nas estirpes de *E. coli*



**Legenda:** M, marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder V; 1, controlo positivo para *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>OXA-1</sub>; 2, controlo positivo para *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>; 3, estirpe negativa para os três genes; 4, estirpe positiva para *bla*<sub>TEM</sub>; 5, estirpe positiva para *bla*<sub>SHV</sub>; 6, controlo negativo (Fotografia original)

**Tabela 10** – Lista de oligonucleótidos iniciadores, com respetivas sequências nucleotídicas, tamanho de produto de PCR e referência, utilizados na técnica de PCR para deteção dos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>OXA-1</sub> nas estirpes de *E. coli*

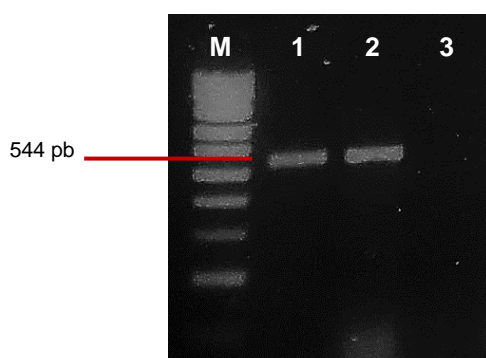
Designação do primer	Sequência nucleotídica (5'→3')	Tamanho produto PCR (pb)	Referência
Bf	TTCCTGTTTTTGCTCACCCA	716	Féria et al. (2002)
Kr	TACGATACGGGAGGGCTTAC		
Shvf	TCAGCGAAAAACACCTTG	471	
Shvr	TCCCGCAGATAAATCACCA		
Oxa-1f	TATCTACAGCAGCGCCAGTG	199	
Oxa-1r	CGCATCAAATGCCATAAGTG		

#### 4.5.2.2 – Deteção de genes que codificam para as β-lactamases do tipo CTX-M e identificação do respetivo grupo

A deteção dos genes que codificam para as β-lactamases CTX-M foi feita em duas etapas. A primeira fase consistiu em detetar uma sequência conservada do gene *bla*<sub>CTX-M</sub> (Figura 15). No caso das amostras positivas foi realizada a amplificação de outras regiões do gene de forma a identificar o grupo a que pertence, nomeadamente, grupo 1 (Figura 16) e grupo 9 (Figura 17). Para a primeira parte foi realizado um PCR adaptado do protocolo descrito por Edelstein, Pimkin, Palagin, Edelstein e Stratchounski (2003). O PCR foi realizado com um volume final de 25 µL contendo água MiliQ esterilizada, Tampão NZYTaQ 1x, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>,

0,2 mM de cada dNTP, 0,25 µM de cada um dos oligonucleótidos iniciadores CTXf e CTXr (Tabela 11), 1U de NZYTa<sub>q</sub> e 1 µL de ADN. A reação decorreu em termociclador e compreendeu uma desnaturação inicial a 94°C durante 7 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94°C), hibridação (2 minutos a 57°C) e extensão (1 minuto a 72°C), acabando com uma extensão final de 10 minutos a 72°C. De forma a ser possível uma correta interpretação dos resultados, para cada PCR foi utilizado um controlo positivo, ADN de uma estirpe padrão previamente sequenciada detentora do gene *bla*<sub>CTX-M</sub> e um controlo negativo, onde não existia ADN.

**Figura 15** – PCR para deteção do gene *bla*<sub>CTX-M</sub> nas estirpes de *E. coli*



**Legenda:** M, marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder V; 1, controlo positivo para *bla*<sub>CTX-M</sub>; 2, estirpe positiva para *bla*<sub>CTX-M</sub>; 3, controlo negativo (Fotografia original)

**Tabela 11** – Lista de oligonucleótidos iniciadores, com respetivas sequências nucleotídicas, tamanho de produto de PCR e referência, utilizados na técnica de PCR para deteção do gene *bla*<sub>CTX-M</sub> nas estirpes de *E. coli*.

Designação do primer	Sequência nucleotídica (5'→3')	Tamanho produto PCR (pb)	Referência
CTX-MF	TTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	544	Edelstein et al. (2003)
CTX-MR	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA-3		

Nas amostras positivas para CTX-M foram realizadas duas reações de PCR. Em primeiro lugar um PCR adaptado do protocolo descrito por Woodford, Fagan e Ellington (2006) para identificação do grupo 1 (Figura 16). Seguidamente, realizou-se um PCR adaptado do protocolo de Guessens et al. (2008) para identificação do grupo 9 nas amostras cujo resultado deu negativo para o grupo 1 (Figura 17).

O PCR para identificação do grupo 1 (Figura 16) foi realizado com um volume final de 25 µL contendo água MiliQ esterilizada, Tampão NZYTa<sub>q</sub> 1x, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada um dos oligonucleótidos iniciadores CTX1f e CTX1r (Tabela 12), 1,25U de NZYTa<sub>q</sub> e 1 µL de ADN. A reação decorreu em termociclador e compreendeu uma desnaturação inicial a 94°C durante 7 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação (1

minuto a 94°C), hibridação (2 minutos a 57°C) e extensão (1 minuto a 72°C), acabando com uma extensão final de 10 minutos a 72°C. De forma a ser possível uma correta interpretação dos resultados, para cada PCR foi utilizado um controlo positivo, ADN de uma estirpe padrão previamente sequenciada pertencente ao grupo CTX-M 1 e um controlo negativo, onde não existia ADN.

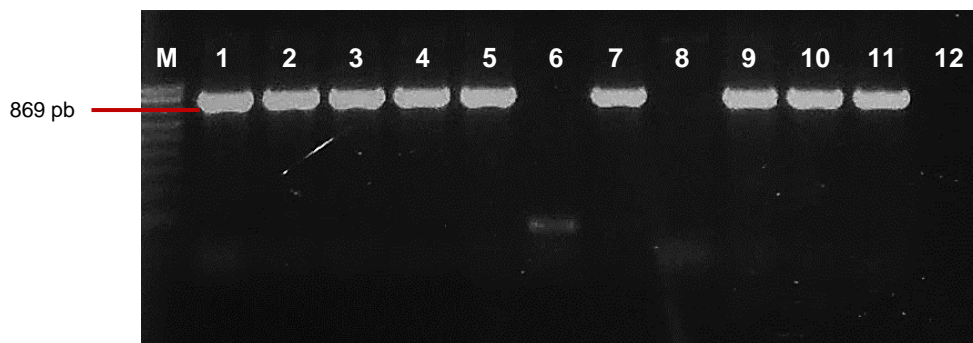
**Figura 16** – PCR para deteção de CTX-M grupo 1 nas estirpes de *E. coli*



**Legenda:** M, marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder V; 1, controlo positivo para CTX-M grupo 1; 2 e 3, estirpes negativas para CTX-M grupo 1; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, estirpes positivas para CTX-M grupo 1; 16, controlo negativo (Fotografia original)

O PCR para identificação do grupo 9 (Figura 17) foi realizado com um volume final de 25 µL contendo água MiliQ esterilizada, Tampão DreamTaq 1x, 3,25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada um dos oligonucleótidos iniciadores CTX9f e CTX9r (Tabela 12), 1,25U de DreamTaq e 1 µL de ADN. A reação decorreu em termociclador e compreendeu uma desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94°C), hibridação (30 segundos a 59°C) e extensão (1 minuto a 72°C), acabando com uma extensão final de 7 minutos a 72°C. De forma a ser possível uma correta interpretação dos resultados, para cada PCR foi utilizado um controlo positivo, ADN de uma estirpe padrão previamente sequenciada pertencente ao grupo CTX-M 9 e um controlo negativo, onde não existia ADN.

**Figura 17** – PCR para deteção de CTX-M grupo 9 nas estirpes de *E. coli*



**Legenda:** M, marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder V; 1, controlo positivo para CTX-M grupo 9; 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10 e 11 estirpes positivas para CTX-M grupo 9; 6 e 8, estirpes negativas para CTX-M grupo 9; 12, controlo negativo (Fotografia original)



**Tabela 12** – Lista de oligonucleótidos iniciadores, com respectivas sequências nucleotídicas, tamanho de produto de PCR e referência, utilizados na técnica de PCR para determinação do grupo de CTX-M nas estirpes de *E. coli*

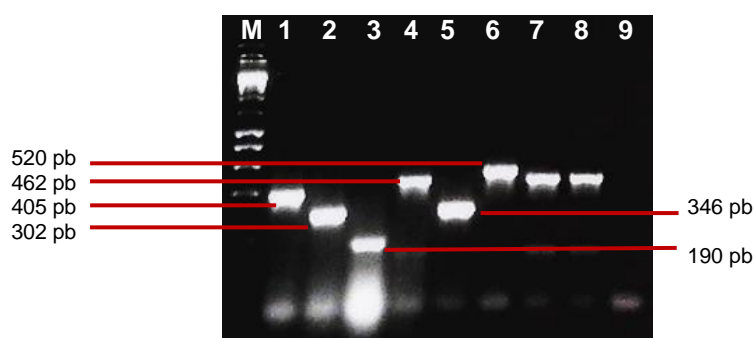
Designação do primer	Sequência nucleotídica (5'→3')	Tamanho produto PCR (pb)	Referência
CTXM1f	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	863	Woodford et al. (2006)
CTXM1r	TTGGTGACGATTTTAGCCGC		
CTXM9f	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA	869	Guessennd et al. (2008)
CTXM9r	CCCTTCGGCGATGATTCTC		

#### 4.5.2.3 – Detecção de genes que codificam para as $\beta$ -lactamases do tipo AmpC

A identificação de genes que codificam para enzimas AmpC plasmídicas, como *bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>ACC</sub>, *bla*<sub>MIR</sub> e *bla*<sub>FOX</sub> foi efetuada por outro multiplex-PCR adaptado do protocolo descrito por Pérez-Pérez e Hanson (2002) (Figura 18). O PCR foi realizado com um volume final de 25  $\mu$ L contendo água MiliQ esterilizada, Tampão NZYTa<sub>q</sub> 1x, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM de cada dNTP, 0,4  $\mu$ M de cada um dos oligonucleótidos iniciadores FOXMF e FOXMR, 0,5  $\mu$ M de cada um dos oligonucleótidos iniciadores ACCMF, ACCMR, EBCMF e EBCMR, 0,6  $\mu$ M de cada um dos oligonucleótidos iniciadores MOXMF, MOXMR, CITMF, CITMR, DHAMF e DHAMR (Tabela 13), 1,25U de NZYTa<sub>q</sub> e 1  $\mu$ L de ADN. A reação decorreu em termociclador e compreendeu uma desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), hibridação (30 segundos a 65°C) e extensão (1 minuto a 72°C), acabando com uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Para este PCR foram utilizados 7 controlos, 6 positivos e 1 negativo. Os controlos positivos continham ADN de estirpes padrão, previamente sequenciadas, sendo cada uma delas detentora de um dos genes de interesse. No controlo negativo não existia ADN.



**Figura 18** – Multiplex-PCR para detecção dos genes *bla<sub>MOX</sub>*, *bla<sub>CMY</sub>*, *bla<sub>DHA</sub>*, *bla<sub>ACC</sub>*, *bla<sub>MIR</sub>* e *bla<sub>FOX</sub>* nas estirpes de *E. coli*



**Legenda:** M, marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder III (NZYtech, Lisboa, Portugal); 1, controlo positivo para o gene *bla<sub>DHA</sub>*; 2, controlo positivo para o gene *bla<sub>MIR</sub>*; 3, controlo positivo para o gene *bla<sub>FOX</sub>*; 4, controlo positivo para o gene *bla<sub>CMY</sub>*; 5, controlo positivo para o gene *bla<sub>ACC</sub>*; 6, controlo positivo para o gene *bla<sub>MOX</sub>*; 7 e 8, estirpes positivas para o gene *bla<sub>CMY</sub>*; 9, controlo negativo (Fotografia original)

**Tabela 13** – Lista de oligonucleótidos iniciadores, com respetivas sequências nucleotídicas, tamanho de produto de PCR e referência, utilizados na técnica de PCR para detecção dos genes *bla<sub>MOX</sub>*, *bla<sub>CMY</sub>*, *bla<sub>DHA</sub>*, *bla<sub>ACC</sub>*, *bla<sub>MIR</sub>* e *bla<sub>FOX</sub>* nas estirpes de *E. coli*

Designação do primer	Sequência nucleotídica (5'→3')	Tamanho produto PCR (pb)	Referência
MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520	Pérez-Pérez & Hanson (2002)
MOXMR	CACATTGACATAGGTGTGGTGC		
CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462	
CITMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		
DHAMF	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405	
DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC		
ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346	
ACCMR	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC		
EBCMF	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302	
EBCMR	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT		
FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190	
FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG		

## 4.6 – Eletroforese

Após a amplificação no termociclador foi efetuada a análise de 10 µL de cada reação de PCR através de uma corrida em gel de agarose (Nzytech, Lisboa, Portugal) 2% (p/v) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) durante 60 minutos a 90V, em tina de eletroforese (VWR). Para cada corrida foram adicionados 5 µL de marcador de peso molecular 100-1000pb (NZYtech, Portugal) de forma a estimar os pesos moleculares dos produtos amplificados. Os produtos de PCR foram visualizados recorrendo a um transluminador ultravioleta (Bio-rad).

## 4.7 – Purificação dos produtos amplificados

Os produtos de PCR foram purificados recorrendo ao sistema de purificação NZYgelpure (NZYtech, Lisboa, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante.

## 4.8 – Sequenciação

Os produtos de PCR purificados foram enviados para sequenciação para a empresa STAB VIDA (Oeiras, Portugal). Neste trabalho foram sequenciados todos os genes de estirpes que apresentavam resistência à amoxicilina/ácido clavulânico e/ou às cefalosporinas de terceira geração. Os genes de estirpes resistentes somente à ampicilina não foram sequenciados, assumindo que se tratariam de  $\beta$ -lactamases TEM-1 ou SHV-1 responsáveis por este fenótipo de resistência.

## 4.9 – Análise estatística

Na análise estatística foi utilizado o programa SAS *statistical software package for Windows*, versão 9.3, (SAS Institute Inc, Cary, North Carolina, USA). A avaliação da evolução da resistência antimicrobiana ao longo do tempo foi determinada através do modelo de regressão logística usando a variável 'ano' como variável continua e um valor de alfa de 0,05. A frequência de resistência é apresentada com intervalo de confiança de 95%. Para fins de análise da frequência de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos incluíram-se os resultados de todas as bactérias mesmo que não tenha sido possível a sua recuperação.

Os critérios de interpretação dos testes de suscetibilidade a antibióticos baseiam-se na concentração do antibiótico no soro ou plasma, apresentando uma concentração mais elevada quando é excretado na urina (Weese et al., 2011). Por este motivo, neste estudo, para efeitos de análise estatística, as estirpes classificadas como intermédias foram incluídos no grupo das estirpes suscetíveis.

Para efeitos de análise estatística, uma estirpe foi considerada resistente às cefalosporinas de terceira geração quando apresentasse resistência a pelo menos umas das cefalosporinas testadas (cefotaxima, ceftazidima e/ou cefovecina).

O teste Exato de Fisher foi utilizado para comparação entre grupos com um valor de alfa de 0,05.

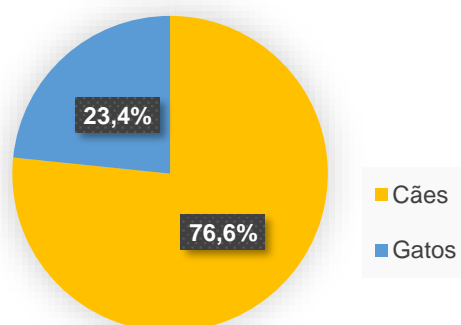
## 5 – Resultados

### 5.1 – Caracterização da amostra

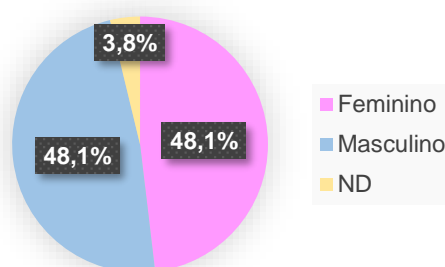
Neste estudo foram utilizadas 415 amostras, 76,6% (n=318) de cão e 23,4% (n=97) de gato (Figura 19). Relativamente às amostras de cão, verificou-se uma igual frequência (48,1%) de fêmeas (n=153/318) e machos (n=153/318), não havendo informação sobre o sexo em 3,8% (n=12/318) dos animais (Figura 20). Quanto às amostras de gato, verificou-se uma predominância do sexo masculino 54,6% (n=53/97) relativamente ao sexo feminino 34,0%

(n=33/97), já 11,3% (n=11/97) das amostras não estavam identificadas quanto ao sexo (Figura 21).

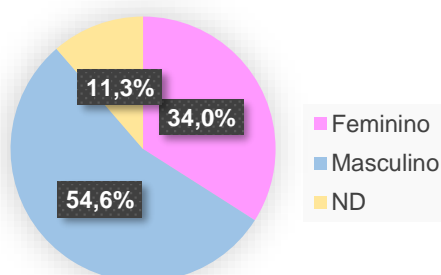
**Figura 19** – Representação gráfica da distribuição das amostras por espécie animal



**Figura 20** – Representação gráfica da distribuição das amostras de cães por gênero



**Figura 21** – Representação gráfica da distribuição das amostras de gatos por gênero



Tendo em consideração as 279 amostras de cão que se encontravam identificadas quanto à idade, os animais desta espécie tinham uma média de oito anos, com um máximo de 18 anos e um mínimo de três meses. Neste estudo a idade mais frequente nos canídeos foi 10 anos, em 11% (n=31/279) das amostras. Em relação às amostras de gato, das 68 amostras que exibiam informação relativamente à idade, os animais apresentavam uma média de nove anos, com um máximo de 25 anos e um mínimo de um mês. Neste estudo a idade mais frequente nos felídeos foi 10 anos, em 15% (n=10/68) das amostras.

## 5.2 – Caracterização global da resistência das estirpes de *E. coli* aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos

As estirpes deste estudo foram classificadas quanto à frequência de resistências observadas nos TSA relativamente aos vários antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Tabela 14). Considerando que todas as estirpes suscetíveis à ampicilina eram igualmente suscetíveis aos restantes antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, aproximadamente metade (53,3%, IC 95% 48,5%-58,1%, n=218/409) das estirpes em estudo não apresentavam resistência a qualquer um dos antibióticos testados. No entanto, é de salientar, a percentagem elevada de resistência às aminopenicilinas como a ampicilina (46,7%).

**Tabela 14** – Frequência das resistências obtidas aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos testados em animais de companhia, pela bactéria *E. coli* no período de 1999-2014.

Antibiótico	n testadas	Frequência absoluta de amostras resistentes	Percentagem (%)	IC 95%
			relativa das amostras resistentes	
AMP	409	191	46,7%	41,9%-51,5%
AMC	411	69	16,8%	13,2%-20,4%
FOX	402	33	8,2%	5,5%-10,9%
CTX	407	40	9,8%	6,9%-12,7%
CAZ	390	31	7,9%	5,2%-10,6%
CVN	331	37	11,2%	1,7%-14,6%

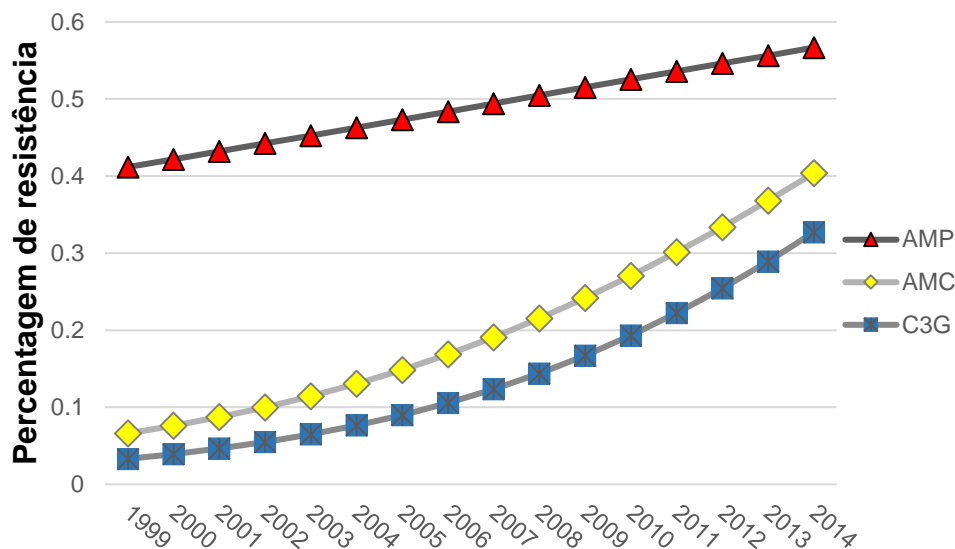
AMP – Ampicilina; AMC – Amoxicilina/ácido clavulânico; FOX – Cefoxitina; CTX – Cefotaxima; CAZ – Ceftazidima; CVN – Cefovecina.

## 5.3 – Evolução da resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos entre 1999 e 2014

A regressão logística (Figura 22) revelou um aumento estatisticamente significativo da resistência à ampicilina ao longo do tempo (1,043 OR, 1-1,087 IC 95%, p=0,0481). Por outro lado, houve um aumento acentuado e estatisticamente significativo da resistência à amoxicilina/ácido clavulânico ao longo do tempo, 1,163 OR (1,097-1,232 IC 95%, p<0,0001). Este aumento foi mais evidente a partir dos anos 2009/2010, em que as estirpes resistentes representam sempre mais de 20% da amostra (Figura 23). Os anos de 2013/2014 destacam-se por apresentarem uma maior percentagem de amostras resistentes à amoxicilina/ácido clavulânico, atingindo valores perto dos 40%. Relativamente às cefalosporinas, a regressão logística demonstrou um aumento significativo (1,194 OR, 1,113-1,280 IC 95%, p<0,0001) da resistência das estirpes de *E. coli* ao longo do tempo (Figura 22). Este aumento torna-se mais claro a partir dos anos 2007/2008, em que as estirpes resistentes constituem valores superiores a 15% (Figura 24). Mais uma vez, os anos de 2013/2014 evidenciam-se por

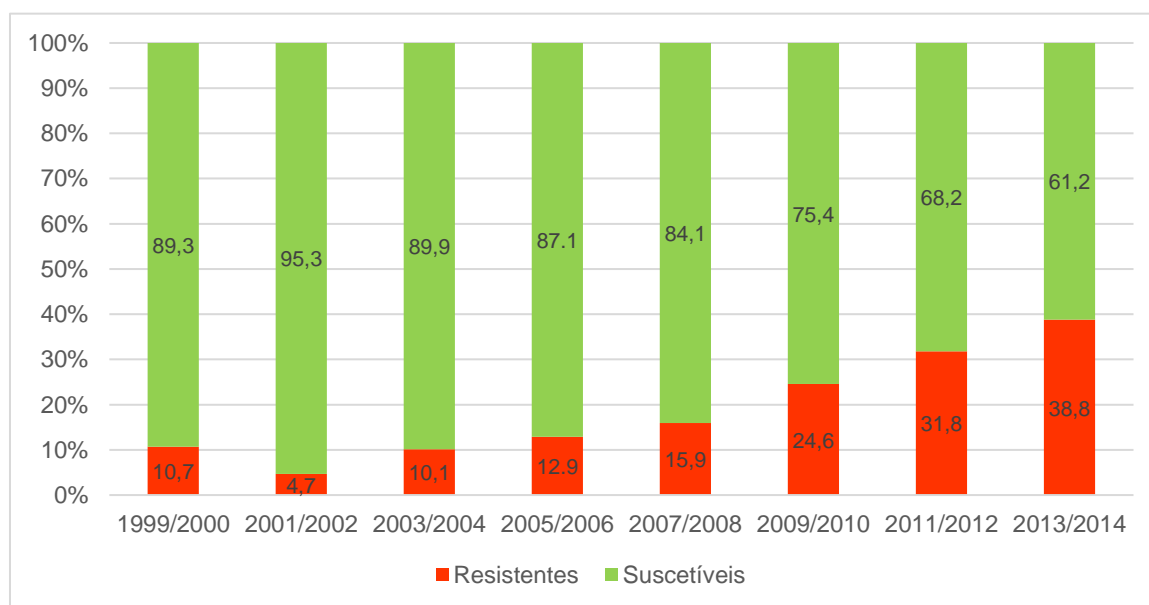
apresentarem uma maior percentagem de estirpes resistentes às cefalosporinas, representando 32,0% da amostra.

**Figura 22** – Representação gráfica da evolução temporal da resistência das estirpes de *E. coli* à ampicilina, à amoxicilina/ácido clavulânico e às cefalosporinas de terceira geração

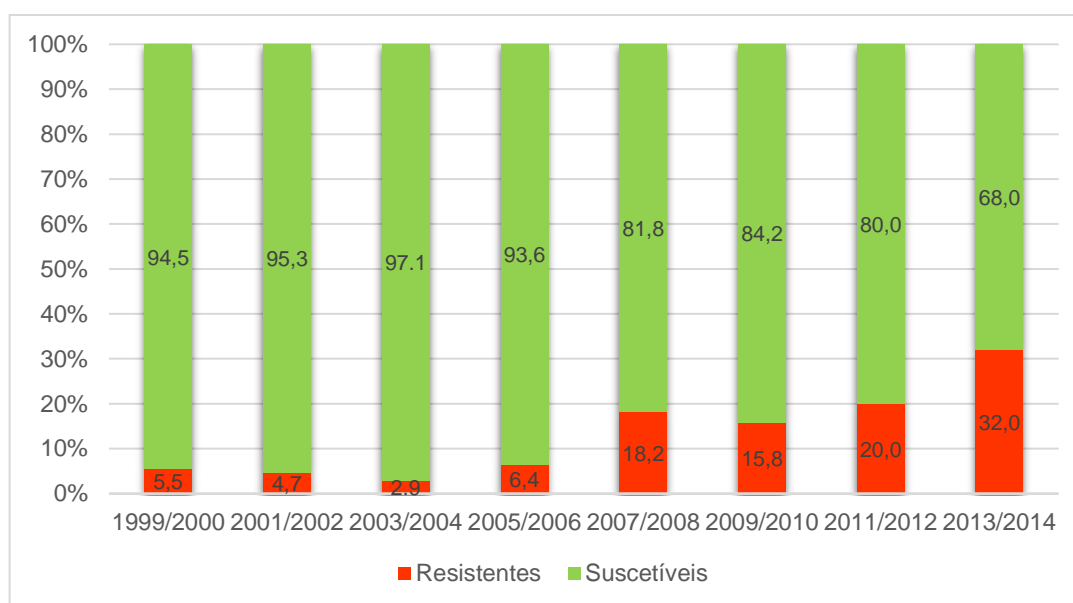


AMP – Ampicilina; AMC – Amoxicilina/ácido clavulânico; C3G – Cefalosporinas de terceira geração.

**Figura 23** – Representação gráfica da percentagem de estirpes de *E. coli* resistentes e suscetíveis à amoxicilina/ácido clavulânico a cada dois anos



**Figura 24** – Representação gráfica da percentagem de estirpes de *E. coli* resistentes e suscetíveis às cefalosporinas de terceira geração a cada dois anos.



#### 5.4 – Caracterização do perfil de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos das estirpes recuperadas

As estirpes recuperadas (n=303) foram caracterizadas quanto ao perfil de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Tabela 15). Aproximadamente metade, 46,2% (IC 95% 40,6%-51,8%, n=140/303), demonstrou ser resistente a pelo menos um dos antibióticos testados, pelo que foram caracterizados os seus mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos. Um número significativo, 32,3% (n=98/303) de estirpes apresentou resistência somente à ampicilina (Tabela 15). A resistência a todos os antibióticos testados revelou-se o segundo perfil de resistência mais frequente, 6,6% (n=20/303) (Tabela 15).

**Tabela 15** – Perfil de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos das estirpes de *E. coli* recuperadas.

Perfil de Resistência				n testadas	Frequência de amostras	Percentagem (%)	IC 95%
AMP	AMC	FOX	C3G				
S	S	S	S	303	163	53,8%	48,2%-59,4%
R	S	S	S		98	32,3%	27,1%-37,6%
R	R	S	S		12	4,0%	1,76%-6,16%
R	S	S	R		5	1,6%	0,2%-3,1%
R	R	S	R		5	1,6%	0,2%-3,1%
R	R	R	R		20	6,6%	3,8%-9,4%

R – Resistente; S – Suscetível; AMP – Ampicilina; AMC – Amoxicilina/ácido clavulânico; FOX – Cefoxitina; C3G – Cefalosporinas de terceira geração.

## 5.5 – Caracterização genotípica das estirpes recuperadas

As estirpes resistentes à ampicilina e suscetíveis a todos os restantes antibióticos  $\beta$ -lactâmicos testados (n=98) foram caracterizadas quanto à presença de genes de resistência *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>OXA-1</sub> (Tabela 16). A maioria destas estirpes, 72,4% (IC 95% 63,6%-81,3%, n=71/98), apresentava o gene *bla*<sub>TEM</sub>. Os genes *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>OXA-1</sub>, embora numa frequência mais baixa, 13,3% (IC 95% 6,6%-20%, n=13/98) e 6,1% (IC 95% 1,4%-10,9%, n=6/98), respetivamente, também foram detetados nestas estirpes. É de salientar que 3,1% (n=3/98) das estirpes exibiam simultaneamente os genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> e que 11,2% (n=11/98) das estirpes não apresentavam nenhum dos genes de resistência testados (Tabela 16).

**Tabela 16** – Genes de resistência detetados nas estirpes de *E. coli* de acordo com o seu perfil de resistência

Perfil de Resistência	Genes de Resistência	n testadas	Frequência de amostras	Percentagem (%)	IC 95%
AMP <sup>r</sup>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	98	68	69,4%	60,3%-78,5%
	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>		10	10,2%	4,2%-16,2%
	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>		6	6,1%	1,4%-10,9%
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV</sub>		3	3,1%	0%-6,5%
	ND		11	11,2%	5,0%-17,5%
AMP <sup>r</sup> AMC <sup>r</sup>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	12	6	50,0%	21,7%-78,3%
	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>		3	25,0%	0,1%-50,0%
	ND		3	25,0%	0,1%-50,0%
AMP <sup>r</sup> C3G <sup>r</sup>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	5	4	80,0%	44,9%-100%
	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>		1	20,0%	0%-55,0%
AMP <sup>r</sup> AMC <sup>r</sup> C3G <sup>r</sup>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	5	2	40,0%	0%-82,9%
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>		1	20,0%	0%-55,0%
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>		2	40,0%	0%-82,9%
AMP <sup>r</sup> AMC <sup>r</sup> FOX <sup>r</sup> C3G <sup>r</sup>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	20	1	5,0%	0%-14,6%
	<i>bla</i> <sub>CMY</sub>		5	25,0%	6,0%-44,0%
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>CMY</sub>		7	35,0%	15,1%-55,9%
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>bla</i> <sub>CMY</sub>		2	10,0%	0%-23,2%
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> + <i>bla</i> <sub>CMY</sub>		1	5,0%	0%-14,6%
	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> + <i>bla</i> <sub>CMY</sub>		1	5,0%	0%-14,6%
	ND		3	15,0%	0%-30,7%

AMP – Ampicilina; AMC – Amoxicilina/ácido clavulânico; FOX – Cefoxitina; C3G – Cefalosporinas de terceira geração; ND – Não detetado; r - Resistente.

As estirpes resistentes à ampicilina e amoxicilina/ácido clavulânico, mas suscetíveis à cefoxitina e cefalosporinas de terceira geração (n=12), foram, igualmente, caracterizadas quanto à presença dos genes de resistência *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>OXA-1</sub> (Tabela 16). Neste caso a presença de *bla*<sub>TEM</sub> (50,0%, n=6/12) predominou, seguida da presença de *bla*<sub>OXA-1</sub> (25%,

n=3/12) (Tabela 16). A sequenciação do gene *bla*<sub>TEM</sub> revelou a presença de *bla*<sub>TEM-1</sub> (n=5/6) e *bla*<sub>TEM-135</sub> (n=1/6).

Nas *E. coli* com resistência à cefoxitina e/ou cefalosporinas de terceira geração, além dos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>OXA-1</sub>, as estirpes foram adicionalmente caracterizadas quanto à presença dos genes *bla*<sub>CTX-M</sub> e AmpC.

A maioria das estirpes (n=8/10) com resistência às cefalosporinas de 3ª geração e suscetibilidade à cefoxitina eram produtoras de *bla*<sub>CTX-M</sub>, estando frequentemente associadas à copresença de *bla*<sub>TEM</sub> (n=7/8) (Tabela 16).

Relativamente às estirpes que exibiam resistência a todos os antibióticos β-lactâmicos testados (n=20) é notável o predomínio do gene *bla*<sub>CMY</sub>, o qual foi detetado em 80,0% (IC 95% 62,5%-97,5%, n=16/20) dos casos (Tabela 16). Embora este gene tenha sido encontrado de forma isolada em 31,2% (IC 95% 8,5%-54,0%, n=5/16) destas estirpes, foi, todavia, mais frequentemente observado em associação com outros genes de resistência aos β-lactâmicos (68,8%, IC 95% 46,0%-91,5%, n=11/16). Em *E. coli* resistente a todos os antibióticos β-lactâmicos testados, a associação *bla*<sub>TEM</sub>+*bla*<sub>CMY</sub> foi a mais frequente (35,0%, n=7/20) (Tabela 16). Verificou-se também a copresença do gene *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>CMY</sub> em 10,0% (IC 95% 0%-23,2%, n=2/20) dos casos (Tabela 16). A presença isolada do gene *bla*<sub>TEM</sub> nas estirpes resistentes a todos os antibióticos β-lactâmicos verificou-se apenas em uma estirpe, cuja sequenciação revelou tratar-se de *bla*<sub>TEM-1</sub>.

De entre as estirpes caracterizadas resistentes às cefalosporinas de terceira geração, as β-lactamases AmpC (53,3%, IC 95% 35,5%-71,2%, n=16/30) foram mais frequentemente detetadas do que as ESBL (33,3%, IC 95% 16,5%-50,2%, n=10/30). No que diz respeito às AmpC, a sequenciação revelou serem todas do tipo CMY-2 (Tabela 17). Estas β-lactamases, embora pontualmente detetadas em amostras correspondentes a anos mais antigos, foram sobretudo detetadas em amostras de anos mais recentes (2011-2014). Quanto às estirpes de *E. coli* produtoras de CTX-M, houve um predomínio do grupo CTX-M1 (Tabela 17).



**Tabela 17** – Caracterização das estirpes de *E. coli* produtoras de ESBL e AmpC

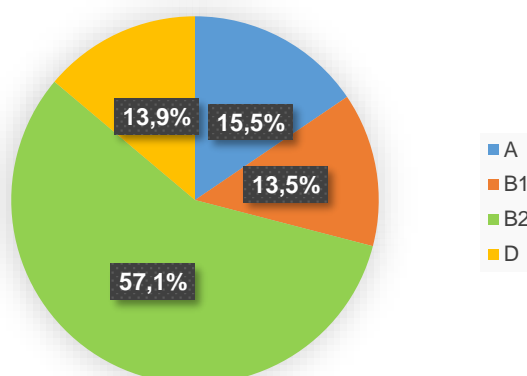
Ano	Nº	Espécie	ESBL/AmpC	Outras β-lactamases	Perfil de Resistência
2000	434/00	Canina	CMY-2	TEM-1	AMP AMC FOX C3G
2001	1953/01	Canina	CMY-2	TEM-1+OXA-1	AMP AMC FOX C3G
2003	203/03	Canina	CMY-2	ND	AMP AMC FOX C3G
2004	5825/04	Canina	CTX-M-15	TEM-1+OXA-1	AMP AMC C3G
2005	6346/05	Felina	CMY-2	ND	AMP AMC FOX C3G
2006	3389/06	Canina	CMY-2	TEM-1	AMP AMC FOX C3G
2007	521/07	Felina	CTX-M-32	TEM-135	AMP C3G
2007	1630/07	Canina	CTX-M-15	TEM-1	AMP C3G
2007	7261/07	Canina	CTX-M-32	TEM-1	AMP C3G
2008	635/08	Felina	CTX-M-32	TEM-1	AMP C3G
2008	2777/08	Felina	CTX-M-15	TEM-1+OXA-1	AMP AMC C3G
2010	1952/10	Felina	CTX-M-9+CMY-2	TEM-1	AMP AMC FOX C3G
2011	25/2011	Felina	CMY-2	ND	AMP AMC FOX C3G
2011	29/2011	Canina	CMY-2	ND	AMP AMC FOX C3G
2013	55/2013	Felina	CMY-2	TEM-1	AMP AMC FOX C3G
2013	58/2013	Felina	CTX-M <sub>grupo1</sub>	TEM-1	AMP C3G
2013	469/13	Canina	CMY-2	TEM-1+OXA-1	AMP AMC FOX C3G
2013	1389/13	Felina	CMY-2	TEM-1	AMP AMC FOX C3G
2013	4479/2013	Canina	CTX-M <sub>grupo1</sub> +CMY-2	OXA-1	AMP AMC FOX C3G
2013	5338/13	Canina	CTX-M <sub>grupo1</sub>	OXA-1	AMP C3G
2014	43/2014	Felina	CMY-2	TEM-1	AMP AMC FOX C3G
2014	546/14	Felina	CMY-2	ND	AMP AMC FOX C3G
2014	966/14	Canina	CMY-2	TEM-1	AMP AMC FOX C3G
2014	1549/14	Felina	CMY-2	TEM-1	AMP AMC FOX C3G

AMP – ampicilina; AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; FOX – cefoxitina; C3G – cefalosporinas de terceira geração; ND – Não detetado.

## 5.6 – Caracterização filogenética das estirpes recuperadas

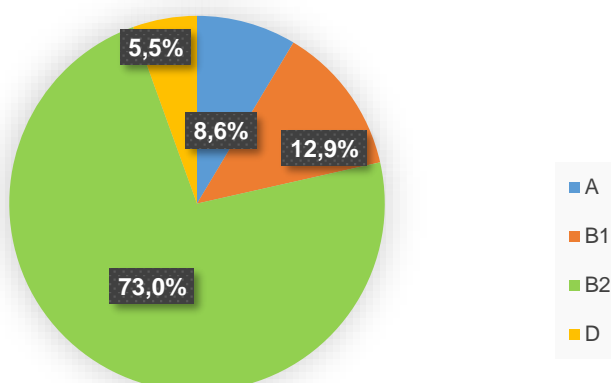
As diferentes estirpes de *E. coli* recuperadas (n=303) foram classificadas segundo os quatro grupos filogenéticos principais (A, B1, B2 e D). Na Figura 25 encontra-se representada a distribuição das estirpes pelos quatro filogrupos, sendo evidente a superioridade do grupo B2, que constitui mais de metade (57,1%, 51,5%-62,7% IC 95%, n=173/303) da amostra em estudo. As restantes estirpes encontram-se distribuídas de forma semelhante pelos restantes grupos filogenéticos.

**Figura 25** – Frequência relativa das estirpes de *E. coli* recuperadas consoante o grupo filogenético



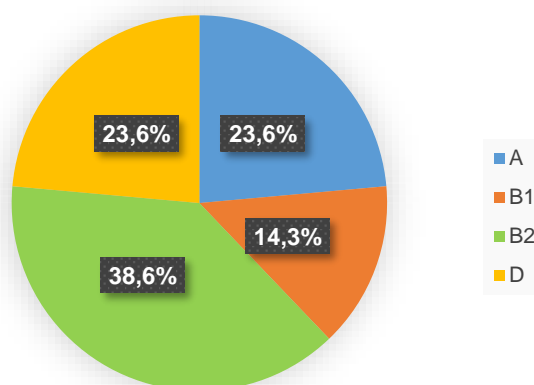
Analisando apenas as estirpes suscetíveis a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos testados ( $n=163$ ), é notável, novamente, a superioridade do filogrupo B2 (73,0%, IC 95% 66,2%-79,8%,  $n=119/163$ ) relativamente aos restantes (Figura 26). Neste caso, o filogrupo D foi o que mostrou estar menos representado (5,5%, IC 95% 2,0%-9,0%,  $n=9/163$ ) (Figura 26).

**Figura 26** – Frequência relativa das estirpes de *E. coli*, suscetíveis a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos testados, consoante o grupo filogenético



Por outro lado, nas estirpes de *E. coli* resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados houve um aumento significativo ( $p<0,001$ ) da frequência do filogrupo D (23,6%, IC 95% 16,5%-30,6%,  $n=33/140$ ) e do filogrupo A (23,6%, IC 95% 16,5%-30,6%,  $n=33/140$ ) com uma diminuição significativa ( $p<0,001$ ) da frequência do filogrupo B2 (38,6%, IC 95% 30,5%-46,6%,  $n=54/140$ ) (Figura 27). O filogrupo B1 não pareceu variar ( $p>0,05$ ) entre as amostras populacionais, suscetível e resistente, aos  $\beta$ -lactâmicos.

**Figura 27** – Frequência relativa das estirpes de *E. coli*, resistentes a pelo menos um dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos testados, consoante o grupo filogenético



Na distribuição dos filogrupos de *E. coli* de acordo com os genes de resistência detetados (Tabela 18), verificou-se que as estirpes em que o gene *bla*<sub>CMY-2</sub> se encontrava presente pertenciam, maioritariamente, ao filogrupo D (81,2%, n=13/16). Constatou-se, também, que as estirpes que possuíam o gene *bla*<sub>SHV</sub> faziam, quase na sua totalidade parte do grupo B2 (92,3%, n=12/13) (Tabela 18). Embora de forma não tão evidente, pareceu haver uma tendência das estirpes que possuíam o gene *bla*<sub>CTX-M</sub> pertencerem ao grupo B2 (40,0%, n=4/10) (Tabela 18).

**Tabela 18** – Distribuição dos vários genes de resistência consoante o grupo filogenético

Genes de Resistência	Frequência do grupo filogenético (n)				n total
	A	B1	B2	D	
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	27,8% (27)	14,4% (14)	35,1% (34)	22,7%(22)	97
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	7,7% (1)	0% (0)	92,3%(12)	0%(0)	13
<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	6,7% (1)	13,3% (2)	40,0% (6)	40,0% (6)	15
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	30,0% (3)	20,0%(2)	40,0% (4)	10,0% (1)	10
<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	0% (0)	12,5% (2)	6,2% (1)	81,2% (13)	16

## 6 – Discussão

As amostras utilizadas neste estudo pertenciam maioritariamente à espécie canina (76,6%), estando de acordo com a literatura que considera a ocorrência de ITU é menos frequente em gatos do que em cães (Chew et al., 2011; Sykes & Westropp, 2014). Em cães, a idade média de diagnóstico, independentemente do sexo, é de sete-oito anos (Ling et al., 2001; Cohn et al., 2003; Seguin et al., 2003), estando em concordância com a amostra canina deste projeto, cuja idade média é de oito anos. Contudo, nesta espécie, não se verificou maior predominância de ITU em cadelas como está descrito (Sykes & Westropp, 2014). Relativamente aos felinos, neste estudo, não parece haver maior predisposição das fêmeas

nem dos gatos geriátricos, como está descrito na literatura (Lekcharoensuk et al., 2001; Chew et al., 2011).

O atual estudo demonstra que em Portugal, mais precisamente na área da grande Lisboa, a resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é um fenómeno prevalente em *E. coli* uropatogénicas de animais de companhia. Analisando a frequência de resistências relativamente aos vários  $\beta$ -lactâmicos testados no período de 1999-2014, ampicilina demonstrou ser o antibiótico em que se verifica maior taxa de resistência (46,7%), representando, aproximadamente, metade da amostra em estudo. Segue-se a combinação amoxicilina/ácido clavulânico (16,8%) e as cefalosporinas de terceira geração (7,9-11,2%). Kroemer et al. (2014) propuseram-se a avaliar, a nível Europeu, a suscetibilidade a antibióticos de bactérias frequentemente isoladas em infeções de animais de companhia. Este estudo, que compreendeu a participação de seis países Europeus (Alemanha, Bélgica, Espanha, França, Holanda e Reino Unido), utilizou amostras recolhidas durante um período de oito anos (2002-2009). Segundo o mesmo, a percentagem de resistência global à ampicilina e amoxicilina/ácido clavulânico em *E. coli* uropatogénica foi de 47,23% e 25,08%, respetivamente. Em Itália, Nebbia et al. (2016) realizaram um estudo retrospectivo relativamente ao período de tempo decorrente entre 2011 e 2014 com o propósito de avaliar a resistência de bactérias Gram-negativas isoladas de gatos com ITU. No que diz respeito a *E. coli*, 55% das estirpes demonstraram ser resistentes à ampicilina, 24% à amoxicilina/ácido clavulânico, enquanto que as cefalosporinas de terceira geração apresentaram valores de 28% e 38% de resistência à ceftazidima e cefotaxima, respetivamente. Embora a frequência global de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos obtidos no presente trabalho seja, aparentemente, inferior aos restantes estudos, este facto pode ser justificado pela inclusão de amostras obtidas em anos bastante anteriores nos quais a resistência era inferior. Se, por sua vez, considerarmos os valores de resistência obtidos para amoxicilina/ácido clavulânico e cefalosporinas de terceira geração a cada dois anos, é possível concluir que os resultados dos vários trabalhos se assemelham.

A regressão logística revelou um aumento significativo da resistência à amoxicilina/ácido clavulânico e cefalosporinas de terceira geração ao longo do tempo. No que diz respeito ao aumento de resistência à amoxicilina/ácido clavulânico, já num estudo retrospectivo realizado no Reino Unido, referente aos anos de 1989-1997, se verificava uma tendência crescente na resistência de *E. coli* isolada a partir de várias infeções em animais de companhia (Normand, Gibson, Reid, Carmichael & Taylor, 2000). Num estudo mais recente realizado na Polónia, o qual utilizou amostras obtidas de diversas infeções em animais de companhia no decurso de sete anos (2007-2013), também se verificou um aumento significativo na resistência de *E. coli* tanto à amoxicilina/ácido clavulânico como às cefalosporinas de terceira geração (Rzewuska et al., 2015). Resultados discordantes foram obtidos por Cummings et al. (2015) num trabalho retrospectivo realizado nos EUA referente a amostras de *E. coli* caninas obtidas entre 2004-2011. Segundo o mesmo, não se verificou uma tendência crescente na resistência aos

antibióticos nas amostras urinárias. A resistência antimicrobiana pode variar geograficamente em consequência das políticas de utilização de antibióticos de cada país, sendo esta uma explicação possível para os resultados distintos dos diferentes trabalhos.

No presente trabalho, a ampicilina constituiu o antibiótico com maior taxa de resistência (46,7%). As penicilinas são os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos mais antigos, sendo por isso expectável a elevada taxa de resistência obtida. De acordo com a venda de antibióticos veterinários para animais de companhia em Portugal, referente ao ano de 2014, as penicilinas são a classe de antibacterianos mais vendidas (EMA, 2016). Em Portugal, as penicilinas encontram-se quase na sua totalidade em combinação com inibidores de  $\beta$ -lactamases (EMA, 2016), o que, em parte, pode justificar o aumento encontrado de resistência à amoxicilina/ácido clavulânico. A resistência à amoxicilina/ácido clavulânico, foi observada num número representativo de estirpes. Nos casos em que se verifica somente resistência à ampicilina e amoxicilina/ácido clavulânico, o mecanismo mais frequentemente encontrado foi a produção da  $\beta$ -lactamase TEM-1 (50,0%). A produção desta  $\beta$ -lactamase constitui um dos mecanismos de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos mais frequentemente detetados nas estirpes de *E. coli* em animais de companhia (Féria et al. 2002; Shaheen et al., 2011; Schmiedel et al., 2014; Chang, Lo, Wei & Kuo, 2015). Este mecanismo, por si só, não deveria conferir resistência aos inibidores da  $\beta$ -lactamase. Contudo, este fenótipo de resistência pode ser explicado por outros mecanismos, nomeadamente a hiperprodução da TEM parental ou à diminuição da expressão de OMPs, concomitante com a presença de TEM-1. A presença de IRT também poderia explicar a resistência observada, todavia, neste estudo, não foi encontrada qualquer  $\beta$ -lactamase deste tipo. Em 25,0% das estirpes resistentes apenas à ampicilina e à amoxicilina/ácido clavulânico verificou-se a presença da  $\beta$ -lactamase OXA-1, capaz de conferir resistência a amoxicilina/ácido clavulânico (Jacoby & Munoz-Price, 2005; Bush & Jacoby, 2010). Ainda a respeito deste fenótipo de resistência, observa-se um número significativo de estirpes apenas resistentes à ampicilina e amoxicilina/ácido clavulânico (25,0%) em que não foi detetado qualquer mecanismo de resistência pesquisado. Nestas situações não se pode descartar a presença de  $\beta$ -lactamases não pesquisadas, ou ainda outros mecanismos, nomeadamente a presença de bombas de efluxo, alteração da permeabilidade e alterações nas PLPs. Na maioria das estirpes em que se verificava resistência à amoxicilina/ácido clavulânico, observava-se também resistência às cefalosporinas de terceira geração. Neste caso, o principal mecanismo responsável pela resistência verificada foi a produção de AmpC pelas estirpes de *E. coli*.

As dez *E. coli* produtoras de ESBL caracterizadas neste estudo eram todas do tipo CTX-M. As ESBL caracterizam-se por conferirem resistência às penicilinas e cefalosporinas de terceira geração, como ceftazidima ou cefotaxima, não exercendo atividade hidrolítica em relação às cefamicinas e sendo inibidas pelos inibidores das  $\beta$ -lactamases como o ácido clavulânico (Lee, Bae & Lee, 2012). Das estirpes detentoras de ESBL caracterizadas neste

estudo, seis apresentavam este fenótipo de resistência. Duas delas, exibiam também resistência a amoxicilina/ácido clavulânico, no entanto, este fenótipo é explicado pela presença simultânea do gene *bla<sub>OXA-1</sub>*, uma vez que, na sua maioria, as  $\beta$ -lactamases OXA mostram alguma resistência à inibição pelo ácido clavulânico (Jacoby & Munoz-Price, 2005; Bush & Jacoby, 2010). Por fim, as restantes duas, exibiam resistência a todos os antibióticos testados, o que pode ser explicado pela presença concomitante da  $\beta$ -lactamase AmpC CMY-2.

É importante referir que não houve a possibilidade de recuperar todas as estirpes que fizeram parte deste estudo retrospectivo e, consequentemente, caracterizar os respetivos mecanismos de resistência. Assim sendo, apesar de não terem sido encontradas ESBL do tipo TEM ou SHV, não se pode descartar a sua presença no grupo de amostras não recuperadas. Apesar das  $\beta$ -lactamases SHV obtidas não terem sido sequenciadas, a hipótese de serem ESBL é reduzida uma vez que as estirpes detentoras destas enzimas apenas apresentavam resistência à ampicilina. Deste modo, existe uma maior probabilidade de serem as  $\beta$ -lactamases SHV-1 responsáveis por este fenótipo de resistência (Bush & Jacoby, 2010). Os resultados obtidos suportam, como está descrito na bibliografia, que ao longo dos anos houve uma franca expansão do tipo CTX-M, representando a família de ESBL mais disseminada mundialmente (Livermore et al., 2007; Cantón et al., 2008; Pitout & Laupland, 2008).

As CTX-M encontradas no presente estudo pertencem maioritariamente ao grupo 1 (90%) à semelhança de estudos prévios em que são caracterizadas *E. coli* uropatogénicas produtoras de ESBL em animais de companhia (O'Keefe, Hutton, Schifferli & Rankin, 2010; Huber, Zweifel, Wittenbrink & Stephan, 2013; Bogaerts et al., 2015) e humanos (Machado et al., 2006; Mendonça, Leitão, Manageiro, Ferreira & Caniça, 2007). Neste estudo, as  $\beta$ -lactamases CTX-M-32 (n=3) e CTX-M-15 (n=3) foram detetadas numa distribuição semelhante. Num estudo realizado por O'Keefe et al. (2010) nos EUA em que foram caracterizadas  $\beta$ -lactamases de *E. coli* de amostras de animais de companhia com ITU, a CTX-M-15 foi a ESBL mais frequentemente encontrada (9/11). Também no estudo de Huber et al. (2013), na Suíça, todas as ESBL caracterizadas (8/8) eram do tipo CTX-M-15. Em Portugal são escassos os trabalhos que caracterizem *E. coli* produtoras de ESBL em animais de companhia doentes, no entanto, estudos referentes a humanos demonstram a prevalência de ESBL do tipo CTX-M, em especial CTX-M-15, em amostras urinárias (Machado et al., 2006; Mendonça et al., 2007).

No presente estudo foi frequente encontrar o gene *bla<sub>CTX-M</sub>* associado a outros genes de resistência, nomeadamente *bla<sub>TEM-1</sub>* e *bla<sub>OXA-1</sub>*, confirmando que *E. coli* produtoras de ESBL podem apresentar mais do que um gene de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (Woodford et al., 2009). A associação CTX-M-15, TEM-1 observada neste estudo foi igualmente verificada noutros estudos de *E. coli* uropatogénica em animais de companhia (O'Keefe et al., 2010; Huber et al., 2013). No presente estudo verificou-se também a associação CTX-M-15, TEM-1 e OXA-1. Num estudo realizado em Portugal em humanos, esta associação foi

frequentemente encontrada em estirpes pertencentes, na sua maioria, a amostras urinárias (Machado et al., 2006).

A primeira CTX-M-15 encontrada neste trabalho diz respeito a uma amostra de 2004, tendo sido devidamente caracterizada num trabalho de Pomba et al. (2009), constituindo a primeira descrição do clone O25b:H4-B2-ST131 em animais de companhia. A semelhança dos genes presentes nesta estirpe relativamente ao trabalho de Machado et al. (2006) corrobora a hipótese da transmissão Homem-animal e animal-Homem do clone O25b:H4-B2-ST131. Continua sem ser claro se são os animais que constituem um reservatório deste clone, ou se, por sua vez, é o Homem que representa o reservatório (Platell, Johnson, Cobbold & Trott, 2011). Num estudo realizado por Johnson, Miller, Johnston, Clabots e Debroy (2009), verificou-se a partilha deste clone entre animais da mesma casa, nomeadamente de um cão com ITU para dois gatos, demonstrando a capacidade de passagem da barreira da espécie. Existe, ainda, um estudo que considera o contacto com animais de companhia um fator de risco para a colonização de *E. coli* produtoras de ESBL (Meyer, Gastmeier, Kola & Schwab, 2012).

Ao contrário do que se verifica com a CTX-M-15, que se encontra disseminada mundialmente, a CTX-M-32, encontrada de forma frequente no presente estudo, parece ter uma localização geográfica mais restrita. Descrita pela primeira vez em Espanha numa estirpe de *E. coli* (Cartelle et al., 2004), é detetada sobretudo nos países mediterrâneos (Coque et al., 2008). No que diz respeito a Portugal, a CTX-M-32, embora descrita no Homem (Caniça et al., 2011), encontra-se também frequentemente em animais de companhia, de produção e silvestres (Simões, Poirel, Da Costa & Nordmann, 2010; Belas et al., 2014; Belas et al., 2015).

A deteção de *E. coli* produtoras de ESBL, designadamente CTX-M, constitui um motivo de grande preocupação na medida em que estas  $\beta$ -lactamases estão geralmente associadas a resistência a outras classes de antibióticos além dos  $\beta$ -lactâmicos, nomeadamente fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e trimetoprim/sulfametoxazol (Machado et al., 2006, Coque et al., 2008), o que limita, grandemente, as opções terapêuticas. Neste estudo foram encontradas 16 estirpes de *E. coli* produtoras de  $\beta$ -lactamases AmpC, sendo todas elas do tipo CMY-2, como se encontra geralmente descrito em animais de companhia (Dierikx et al., 2012; Ewers et al., 2012; Tamang et al., 2012; Hordijk et al., 2013; Schink, Kadlec, Kaspar, Mankertz & Schwarz, 2013; Bortolaia, Hansen, Nielsen, Fritsche & Guardabassi, 2014). A elevada frequência de  $\beta$ -lactamases CMY-2, constitui um motivo de grande preocupação, visto que além de conferirem resistência às cefalosporinas de terceira geração e cefamicinas, não são afetadas pelos inibidores das  $\beta$ -lactamases (Bush & Jacoby, 2010). De facto, neste estudo, as estirpes detentoras de CMY-2 revelaram-se resistentes a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos testados. No estudo de Nebbia et al. (2016) foi frequente encontrar estirpes produtoras de CMY-2 (34%), estando esta  $\beta$ -lactamase sempre associada a uma CTX-M. No presente estudo verificou-se essa situação em dois casos, num dos quais foi observada a

associação CTX-M-9/CMY-2. Esta associação foi igualmente verificada num estudo realizado em França sobre ESBL e AmpC presentes na microbiota fecal canina (Haenni, Saras, Métayer, Médaille & Madec, 2014). Num trabalho sobre *E. coli* multirresistente de ITU canina realizado no Reino Unido, verificou-se também uma enorme prevalência de CMY-2 (Wagner, Gally & Argyle, 2014). No presente estudo esta  $\beta$ -lactamase é detetada numa estirpe referente ao ano 2000, todavia é a partir de 2011 que se verifica uma expansão de CMY-2, particularmente nos dois últimos anos estudados, 2013 e 2014. Em Portugal foi realizado um estudo sobre a microbiota fecal de animais de companhia utilizando amostras referentes a 2003, não tendo sido detetada qualquer estirpe produtora de CMY-2 (Costa et al., 2008). Por sua vez, num trabalho mais recente sobre microbiota fecal de animais de companhia, que utilizou amostras correspondentes a 2010/2011, verificou-se uma prevalência elevada de CMY-2 nas estirpes resistentes (Belas et al., 2014). A microbiota intestinal tem sido descrita como um reservatório importante de bactérias resistentes aos antibióticos (Penders, Stobberingh, Savelkoul & Wolffs, 2013). Considerando que as ITUs são provocadas, maioritariamente, por microrganismos que atingem o trato urinário por via ascendente a partir da área periuretral (Smee et al., 2013a), não é de estranhar que a maior deteção de ESBL/AmpC nos anos mais recentes do presente estudo seja acompanhada por uma maior prevalência de ESBL/AmpC em estudos recentes sobre microbiota fecal de animais de companhia. No que diz respeito às ESBL/AmpC obtidas neste estudo sobre ITU, podemos observar que os resultados são semelhantes aos do trabalho de Belas et al. (2014) sobre microbiota fecal canina. À semelhança do presente estudo, também no trabalho de Belas et al. (2014), sobre colonização fecal de *E. coli*, se verificou que todas as ESBL detetadas eram do tipo CTX-M, na sua maioria do grupo 1, existindo, igualmente, enorme prevalência de CMY-2.

No presente trabalho, nas estirpes que exibiam resistência às cefalosporinas de terceira geração foi mais frequente identificar *E. coli* produtores de AmpC do que ESBL, estando em concordância com o estudo de Wagner et al. (2014). Contudo estes resultados são discordantes com os obtidos em estudos de ITU no Homem nos quais *E. coli* se encontra geralmente associada à produção de ESBL em detrimento de AmpC (Sasirekha, 2013).

A disseminação de ESBL e AmpC representa um motivo de grande preocupação na medida em que pode estar associada à resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos como os carbapenemos. Diversos estudos relatam que os genes que codificam as carbapenemases podem estar associados a ESBL do tipo CTX-M-15, nomeadamente ao clone ST131 (Mantengoli et al., 2011; Morris et al., 2011; Naas, Cuzon, Gaillot, Courcol & Nordmann, 2011). Por outro lado, já foi igualmente reconhecido que a coexistência de CTX-M associada a uma reduzida expressão de OmpF e OmpC pode conduzir a resistência aos carbapenemos (Lartigue, Poirel, Poyart, Réglie-Poupet & Nordmann, 2007; Girlich, Poirel & Nordmann, 2009). Do mesmo modo, *E. coli* produtoras de CMY-2 em que se verifica simultaneamente



deficiências a nível dos canais de porina, podem apresentar resistência aos carbapenemos (Chia et al., 2009; Goessens et al., 2013).

Existem diversas razões para o aumento da prevalência de ESBL e AmpC, tendo sido sugerido o uso de antibióticos como um fator de risco importante (Damborg, Gaustad, Olsen & Guardabassi, 2011; Damborg, Marskar, Baptiste & Guardabassi, 2012). A Comissão Europeia concedeu a autorização de introdução no mercado de cefovecina para uso veterinário em 2006 (EMA, 2006). Curiosamente, neste estudo, verificou-se um aumento considerável na resistência às cefalosporinas de terceira geração a partir de 2007, associada, como seria de esperar, a um aumento na produção de ESBL e AmpC.

De acordo com vários estudos, as ExPEC e as estirpes comensais apresentam uma disparidade no que diz respeito à filogenia (Johnson et al., 2001b; Tenaillon et al., 2010). Enquanto que as ExPEC pertencem maioritariamente ao grupo B2 e em menor escala ao grupo D, as estirpes comensais são, na sua generalidade, do grupo filogenético A e B1 (Bingen et al., 1998; Picard et al., 1999; Duriez et al., 2001; Johnson et al., 2001b). No presente estudo, na distribuição das 303 estirpes recuperadas pelos quatro filogrupos, fica claro o predomínio do grupo B2 (57,1%) relativamente aos restantes grupos, constituindo mais de metade da amostra estudada. Contudo, o grupo D, não apresentou maior relevância que os filogrupos A e B1. Estudos prévios realizados no Brasil e Itália sobre filogenia de *E. coli* isolada de cães e gatos com ITU exibiram resultados semelhantes, com uma prevalência de estirpes do grupo B2 de 62% e 65%, respetivamente (Tramuta, Nucera, Robino, Salvarani & Nebbia, 2011; Osugui, Pestana de Castro, Iovine, Irino & Carvalho, 2014). Comparando as estirpes que são suscetíveis a todos os antibióticos testados com as que se mostram resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados verificam-se resultados diferentes quanto à filogenia. O grupo constituído por estirpes suscetíveis (n=163) pertence na sua maioria ao filogrupo B2 (73,0%) estando os restantes grupos fracamente representados. Por sua vez, no grupo composto pelas estirpes resistentes a pelo menos a um dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos testados (n=140), verifica-se um aumento significativo do filogrupo D e filogrupo A, com uma diminuição significativa da frequência do filogrupo B2. Estudos recentes em animais de companhia exibiram resultados semelhantes, com as estirpes suscetíveis de ITU a pertencerem principalmente ao grupo B2 e as resistentes ao D (Osugui et al., 2014; Wagner et al., 2014).

No presente estudo verifica-se uma forte associação entre o gene *bla*<sub>CMY-2</sub> e o grupo filogenético D. Estudos prévios documentam igualmente esta associação (Sidjabat et al., 2009; Oteo et al., 2010). No presente trabalho a resistência das estirpes de *E. coli* a todos os antibióticos testados é devida, principalmente, à produção de CMY-2. Verificando-se a associação desta  $\beta$ -lactamase com filogrupo D, assim se justifica a supremacia deste grupo filogenético nas estirpes resistentes. Neste trabalho, observa-se, igualmente, uma forte

correlação entre o gene *bla*<sub>SHV</sub> e o grupo filogenético B2, situação previamente documentada num estudo de Branger et al. (2005).

## 7 – Conclusão

No presente estudo foi possível constatar que, no que diz respeito a *E. coli* de ITU de animais de companhia, se tem verificado um aumento significativo na resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, em particular, amoxicilina/ácido clavulânico e cefalosporinas de terceira geração. Esta situação constitui uma enorme preocupação a nível de saúde pública uma vez que se tratam de antimicrobianos criticamente importantes para o Homem. Os valores elevados de resistência às cefalosporinas de terceira geração observados nos últimos anos, devem-se, principalmente, à existência de *E. coli* produtoras de ESBL, do tipo CTX-M, e AmpC, do tipo CMY-2. Como as CMY-2 conferem, igualmente, resistência aos inibidores das  $\beta$ -lactamases, o aumento na deteção de CMY-2 pode ser apontado como uma das principais razões para o aumento da resistência à amoxicilina/ácido clavulânico. *E. coli* produtoras de ESBL e AmpC estão, comumente, associadas à resistência a outras classes de antibióticos além dos  $\beta$ -lactâmicos, nomeadamente fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e trimetoprim/sulfametoxazol limitando, grandemente, as opções terapêuticas.

Considerando a possibilidade de transmissão de bactérias resistentes entre animais de companhia e humanos, este estudo realça a importância do papel do médico veterinário na educação do proprietário do animal, no que diz respeito a adesão à terapêutica e práticas de higiene relativamente ao contacto com o animal de companhia. Este estudo salienta, ainda, a relevância da existência de um programa eficaz de monitorização de resistências bacterianas capaz de orientar o médico veterinário na melhor estratégia antimicrobiana a adotar.

## 8 – Bibliografia

- Abraham, E.P. & Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146, 837-837.
- Adam, D. (2002). Beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations in empiric management of pediatric infections. *Journal of International Medical Research*, 30(1), 10-19.
- Alekshun, M.N. & Levy, S.B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), 1037-1050.
- Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J. & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 251-259.
- Ambler, R.P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 289(1036), 321-331.
- Andersson, D.I. & Hughes, D. (2012). Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resistance Updates*, 15(3), 162-172.
- Angel-Díaz, M., Ramón-Hernández, J., Martínez-Martínez, L., Rodríguez-Baño, J. & Pascual, A. (2009). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in spanish hospitals: 2nd multicenter study (GEIH-BLEE project, 2006). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(9), 503-510.
- Asbel, L.E. & Levison, M.E. (2000). Cephalosporins, carbapenems, and monobactams. *Infectious Disease Clinics of North America*, 14(2), 435-447.
- Bailiff, N.L., Nelson, R.W., Feldman, E.C., Westropp, J.L., Ling, G.V., Jang, S.S. & Kass, P.H. (2006). Frequency and risk factors for urinary tract infection in cats with diabetes mellitus. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(4), 850-855.
- Bailiff, N.L., Westropp, J.L., Nelson, R.W., Sykes, J.E., Owens, S.D. & Kass, P.H. (2008). Evaluation of urine specific gravity and urine sediment as risk factors for urinary tract infections in cats. *Veterinary Clinical Pathology*, 37(3), 317-322.
- Banerjee, R. & Johnson, J.R. (2014). A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(9), 4997-5004.
- Bartges, J.W. (2004). Diagnosis of urinary tract infections. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 34(4), 923-933.
- Bauer, N., Rettig, S. & Moritz, A. (2008). Evaluation the clinitek status automated dipstick analysis device for semiquantitative testing of canine urine. *Research in Veterinary Science*, 85(3), 467-472.
- Bauernfeind, A., Chong, Y. & Schweighart, S. (1989). Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection*, 17(5), 316-321.
- Bauernfeind, A., Grimm, H. & Schweighart, S. (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, 18(5), 294-298.

- Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R. & Giamarellou, H. (1996). Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(1), 221–224.
- Bauernfeind, A., Schneider, I., Jungwirth, R., Sahly, H. & Ullmann, U. (1999). A novel type of AmpC beta-lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(8), 1924-1931.
- Bebrone, C., Lassaux, P., Vercheval, L., Sohier, J.S., Jehaes, A., Sauvage, E. & Galleni, M. (2010). Current challenges in antimicrobial chemotherapy: focus on  $\beta$ -lactamase inhibition. *Drugs*, 70(6), 651-679.
- Beceiro, A., Tomás, M. & Bou, G. (2012). Antimicrobial resistance and virulence: a beneficial relationship for the microbial world? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(8), 492-499.
- Bélangier, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E. & Dozois C.M. (2011). *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 62(1), 1-10.
- Belas, A., Salazar, A.S., Gama, L.T., Couto, N. & Pomba, C. (2014). Risk factors for faecal colonisation with *Escherichia coli* producing extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in dogs. *Veterinary Record*, 175(8), 202.
- Belas, A., Couto, N., Centeno, M., Marques, C., Fernandes, L., Cavaco-Silva, P. & Pomba, C. (2015). Are animals a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains and blaCTX-M-1/32 epidemic plasmids for humans? *25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*, 25-28 April 2015, Copenhagen, Denmark.
- Bennett, P.M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153(1), 347-357.
- Bien, J., Sokolova O. & Bozko, P. (2012). Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International Journal of Nephrology*, 2012, 681473.
- Bingen, E., Picard, B., Brahimi, N., Mathy, S., Desjardins, P., Elion, J. & Denamur, E. (1998). Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *The Journal of Infectious Diseases*, 177(3), 642-650.
- Bogaerts, P., Huang, T.D., Bouchahrouf, W., Bauraing, C., Berhin, C., El Garch, F. & Glupczynski, Y. (2015). Characterization of ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from diseased companion animals in Europe. *Microbial Drug Resistance*, 21(6), 643-650.
- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 1-14.
- Bonomo, R.A. & Rice, L.B. (1999). Inhibitor resistant class A beta-lactamases. *Frontiers in Bioscience*, 4, 34-41.
- Bortolaia, V., Hansen, K.H., Nielsen, C.A., Fritsche, T.R. & Guardabassi, L. (2014). High diversity of plasmids harbouring blaCMY-2 among clinical *Escherichia coli* isolates from

humans and companion animals in the upper Midwestern USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(6), 1492-1496.

- Boyd, E.F. & Hartl, D.L. (1998). Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. *Journal of Bacteriology*, 180(5), 1159-1165.
- Brahmi, S., Dunyach-Rémy, C., Touati, A. & Lavigne, J.P. (2015). CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone O25b-ST131 isolated from wild fish in Mediterranean Sea. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(3), 18-20.
- Branger, C., Zamfir, O., Geoffroy, S., Laurans, G., Arlet, G., Thien, H.V., Gouriou, S., Picard, B. & Denamur, E. (2005). Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerging Infectious Diseases*, 11(1), 54-61.
- Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Ron, E., Hacker, J. & Dobrindt, U. (2009). Adaptation of pathogenic *E. coli* to various niches: genome flexibility is the key. *Genome Dynamics*, 6, 110-125.
- Bush, K. (1988). Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clinical Microbiology Reviews*, 1(1), 109-123.
- Bush, K. (1989). Characterization of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(3), 259-263.
- Bush, K., Jacoby, G.A. & Medeiros, A.A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6), 1211-1233.
- Bush, K. (2010). Alarming  $\beta$ -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Current Opinion in Microbiology*, 13(5), 558-564.
- Bush, K. & Macielag, M.J. (2010). New  $\beta$ -lactam antibiotics and  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 20(10), 1277-1293.
- Bush, K. & Jacoby, G.A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969-976.
- Cabello, F.C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7), 1137-1144.
- Caníça, M., Clemente, L., Jones-Dias, D., Manageiro, V., Themudo, P., Albuquerque, T. Francisco, A.P., Louro, D. & Ferreira, E. (2011). Epidemiologia e potencial zoonótico de estirpes de *Escherichia coli* produtoras de  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 em Portugal [abstract]. In Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias (Eds.) *Proceedings of the 5th Congress of the Portuguese Society of Veterinary Sciences - Veterinary Sciences Congress 2011: Santarém, Portugal, 13-15 October*, pp. 127.
- Cantón, R., Coque, T.M. & Baquero, F. (2003). Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16(4), 315-325.
- Cantón, R. & Coque, T.M. (2006). The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5), 466-475.

- Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F. & Coque, T.M. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(1), 144-153.
- Carattoli, A., Lovari, S., Franco, A., Cordaro, G., Di Matteo, P. & Battisti, A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 833-835.
- Carattoli, A. (2008). Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (1), 117-123.
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2227-2238.
- Carattoli, A. (2011). Plasmids in gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(8), 654-658.
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 298-304.
- Cartelle, M., del Mar Tomas, M., Molina, F., Moure, R., Villanueva, R. & Bou, G. (2004). High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6), 2308-2313.
- Çetin, C., Sentürk, S., Kocabiyik, A.L., Temizel, M. & Özel, E. (2003). Bacteriological examination of urine samples from dogs with symptoms of urinary tract infection. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 27(5), 1225-1229.
- Chaïbi, E.B., Sirot, D., Paul, G. & Labia, R. (1999). Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43(4), 447-458.
- Chang, S.K., Lo, D.Y., Wei, H.W. & Kuo, H.C. (2015). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from canine urinary tract infections. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(1), 59-65.
- Chen, I. & Dubnau, D. (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 241-249.
- Chen, H.D. & Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 83-98.
- Chevalier, J., Mulfinger, C., Garnotel, E., Nicolas, P., Davin-Régli, A. & Pagès, J.M. (2008). Identification and evolution of drug efflux pump in clinical *Enterobacter aerogenes* strains isolated in 1995 and 2003. *PLoS ONE*, 3(9), e3203.
- Chew, D.J., DiBartola, S.P. & Schenck, P.A. (2011). Cystitis and urethritis: urinary tract infection. In D.J. Chew, S.P. DiBartola & P.A. Schenck, *Canine and feline nephrology and urology*, (2nd ed.). (pp.240-271). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Chia, J.H., Siu, L.K., Su, L.H., Lin, H.S., Kuo, A.J., Lee, M.H. & Wu, T.L. (2009). Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Taiwan: resistance due to combined CMY-2 production and porin deficiency. *Journal of Chemotherapy*, 21(6), 621-626.

- Chong, Y., Ito, Y. & Kamimura, T. (2011). Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), 1499-1504.
- Clarke, B., Hiltz, M., Musgrave, H. & Forward, K.R. (2003). Cephamycin resistance in clinical isolates and laboratory-derived strains of *Escherichia coli*, Nova Scotia, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 9(10), 1254-1259.
- Clermont, O., Bonacorsi, S. & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555-4558.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard: Fourth Edition*. Pennsylvania: CLSI.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*. Pennsylvania: CLSI.
- Cohn, L.A., Gary, A.T., Fales, W.H. & Madsen, R.W. (2003). Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15(4), 338-343.
- Coque, T.M., Baquero, F. & Cantón, R. (2008). Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill*, 13(47), 19044.
- Costa, D., Poeta, P., Briñas, L., Sáenz, Y., Rodrigues, J. & Torres, C. (2004). Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(5), 960-961.
- Costa, D., Poeta, P., Sáenz, Y., Coelho, A.C., Matos, M., Vinué, L., Rodrigues, J. & Torres, C. (2008). Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Veterinary Microbiology*, 127(1-2), 97-105.
- Cox, G. & Wright, G.D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(3-7), 287-292.
- Cummings, K.J., Aprea, V.A. & Altier, C. (2015). Antimicrobial resistance trends among canine *Escherichia coli* isolates obtained from clinical samples in the northeastern USA, 2004-2011. *The Canadian Veterinary Journal*, 56(4), 393-398.
- Damborg, P., Gaustad, I.B., Olsen, J.E. & Guardabassi, L. (2011). Selection of CMY-2 producing *Escherichia coli* in the faecal flora of dogs treated with cephalexin. *Veterinary Microbiology*, 151(3-4), 404-408.
- Damborg, P., Marskar, P., Baptiste, K.E. & Guardabassi, L. (2012). Faecal shedding of CTX-M-producing *Escherichia coli* in horses receiving broad-spectrum antimicrobial prophylaxis after hospital admission. *Veterinary Microbiology*, 154(3-4), 298-304.
- D'Andrea, M.M., Arena, F., Pallecchi, L. & Rossolini, G.M. (2013). CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 305-317.
- Datta, N. & Kontomichalou, P. (1965). Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature*, 208(5007), 239-241.

- Davies, J. & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433.
- Dho-Moulin, M. & Fairbrother, J.M. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, 30(2-3), 299-316.
- DiBartola, S.P. & Westropp, J.L. (2014). Urinary tract disorders. In R.W. Nelson & C.G. Couto, *Small animal internal medicine*. (5th ed.). (pp. 629-712). St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby.
- Dierikx, C.M., van Duijkeren, E., Schoormans, A.H., van Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Kant, A., Huijsdens, X.W., van der Zwaluw, K., Wagenaar, J.A. & Mevius, D.J. (2012). Occurrence and characteristics of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(6), 1368-1374.
- Diestra, K., Juan, C., Curiao, T., Moyá, B., Miró, E., Oteo, J., Coque, T.M., Pérez-Vázquez, M., Campos, J., Cantón, R., Oliver, A. & Navarro, F. (2009). Characterization of plasmids encoding *bla*ESBL and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(1), 60-66.
- Dolejska, M., Frolkova, P., Florek, M., Jamborova, I., Purgertova, M., Kutilova, I., Cizek, A., Guenther, S. & Literak, I. (2011). CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella spp.* isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(12), 2784-2790.
- Donowitz, G.R. & Mandell, G.L. (1988). Beta-lactam antibiotics. *The New England Journal of Medicine*, 318(7), 419-426.
- Dossin, O., Germain, C. & Braun, J.P. (2003). Comparison of the techniques of evaluation of urine dilution/concentration in the dog. *Journal of Veterinary Medicine Series A-physiology Pathology Clinical Medicine*, 50(6), 322-325.
- Doumith, M., Day, M.J., Hope, R., Wain, J. & Woodford, N. (2012). Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9), 3108-3110.
- Doyle, R.J., Chaloupka, J. & Vinter, V (1988). Turnover of cell walls in microorganisms. *Microbiological Reviews*, 52(4), 554-567.
- Dramsi, S., Magnet, S., Davison, S. & Arthur, M. (2008). Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 307-320.
- Drawz, S.M. & Bonomo, R.A. (2010). Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 160-201.
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W. & Jarlier, V. (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(1), 90-103.
- Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventré, A., Elion, J., Picard, B. & Denamur, E. (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology*, 147(6), 1671-1676.



- Džidić, S., Šušković, J. & Kos, B. (2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology*, 46(1), 11-21.
- Economou, V. & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, 8, 49-61.
- Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I. & Stratchounski L. (2003). Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(12), 3724-3732.
- El Salabi, A. Walsh, T.R. & Chouchani, C. (2013). Extended spectrum  $\beta$ -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(2), 113-122.
- Encyclopædia Britannica, Inc. (2009). *Antibiotic resistance – mechanisms of resistance*. Acedido em Jul. 15, 2016, disponível em <https://www.britannica.com/science/antibiotic-resistance>
- Enger, E.D. & Ross, F.C. (2003). *Concepts in biology*. (10th ed.). London: McGraw-Hill.
- English, A.R., Retsema, J.A., Girard, A.E., Lynch, J.E. & Barth, W.E. (1978). CP-45,899, a beta-lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of beta-lactams: initial bacteriological characterization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 14(3), 414-419.
- Escherich T. (1988). The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. *Reviews of Infectious Diseases*, 10(6), 1220-1225.
- Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.B., Bui, H., Le Bouguénec, C. & Denamur, E. (2004). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*, 21(6), 1085-1094.
- Essack, S.Y. (2001). The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. *Pharmaceutical Research*, 18(10), 1391-1399.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2015). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014 - Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. Stockholm: ECDC. Acedido em Fev. 14, 2016, disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf>
- European Medicines Agency (2006). *European public assessment report (EPAR) - Convenia*. London: EMA. Acedido em Set. 8, 2016, disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/veterinary/000098/WC500062062.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/000098/WC500062062.pdf)
- European Medicines Agency (2015). *Reflection paper on the risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals*. London: EMA. Acedido em Jun. 24, 2016, disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2015/01/WC500181642.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/01/WC500181642.pdf)
- European Medicines Agency (2016). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 29 European countries in 2014. Trends from 2011 to 2014. Sixth ESVAC report*. London: EMA. Acedido em Jun. 24, 2016, disponível em:

- Ewers, C., Grobbel, M., Stamm, I., Kopp, P.A., Diehl, I., Semmler, T., Fruth, A., Beutlich, J., Guerra, B., Wieler, L.H. & Guenther, S. (2010). Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(4), 651-660.
- Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S. & Wieler, L.H. (2012). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), 646-655.
- Fairbrother, J.M. & Nadeau, E. (2006). *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Revue Scientifique et Technique*, 25(2), 555-569.
- Féria, C., Ferreira, E., Correia, J.D., Gonçalves, J. & Caniça, M. (2002). Patterns and mechanisms of resistance to beta-lactams and beta-lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(1), 77-85.
- Fernandes, R., Amador, P. & Prudêncio, C. (2013).  $\beta$ -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*, 24(1), 7-17.
- Fisher, J., Belasco, J.G., Charnas, R.L., Khosla, S. & Knowles, J.R. (1980). Beta-lactamase inactivation by mechanism-based reagents. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 289(1036), 309-319.
- Fisher, J.F., Meroueh, S.O. & Mobashery, S. (2005). Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chemical Reviews*, 105(2), 395-424.
- Forrester, S.D., Troy, G.C., Dalton, M.N., Huffman, J.W. & Holtzman, G. (1999). Retrospective evaluation of urinary tract infection in 42 dogs with hyperadrenocorticism or diabetes mellitus or both. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13(6), 557-560.
- Fritsche, T.R., Sader, H.S. & Jones, R.N. (2008). Antimicrobial activity of ceftobiprole, a novel anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cephalosporin, tested against contemporary pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2005-2006). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 61(1), 86-95.
- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O. & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 722-732.
- Furuya, E.Y. & Lowy, F.D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology*, 4(1), 36-45.
- Gaillot, O., Clément, C., Simonet, M. & Philippon, A. (1997). Novel transferable beta-lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39(1), 85-87.

- Georgopapadakou, N.H. (1993). Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(10), 2045-2053.
- Ghuysen, J.M. (1991). Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annual Review of Microbiology*, 45, 37-67.
- Girlich, D., Poirel, L. & Nordmann, P. (2009). CTX-M expression and selection of ertapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 832–834.
- Goessens, W.H., van der Bij A.K., van Boxtel, R., Pitout, J.D., van Ulsen, P., Melles, D.C. & Tommassen, J. (2013). Antibiotic trapping by plasmid-encoded CMY-2  $\beta$ -lactamase combined with reduced outer membrane permeability as a mechanism of carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), 3941-3949.
- Gonzalez Leiza, M., Perez-Diaz, J.C., Ayala, J., Casellas, J.M., Martinez-Beltran, J., Bush, K. & Baquero, F. (1994). Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase with two molecular variants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(9), 2150-2157.
- Gould, I.M. (2009). Antibiotic resistance: the perfect storm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34(3), 2-5.
- Gould, I.M., David, M.Z., Esposito, S., Garau, J., Lina, G., Mazzei, T. & Peters, G. (2012). New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(2), 96-104.
- Guardabassi, L., Schwarz, S. & Lloyd D.H. (2004). Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(2), 321-332.
- Guessennd, N., Bremont, S., Gbonon, V., Kacou-Ndouba, A., Ekaza, E., Lambert, T., Dosso, M. & Courvalin, P. (2008). [Qnr-type quinolone resistance in extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteria in Abidjan, Ivory Coast]. *Pathologie Biologie*, 120(1-2), 75-80.
- Gupta, V. (2007). An update on newer beta-lactamases. *Indian Journal of Medical Research*, 126(5), 417-427.
- Haenni, M., Saras, E., Métayer, V., Médaille, C. & Madec, J.Y. (2014). High prevalence of *bla*CTX-M-1/*IncI1*/ST3 and *bla*CMY-2/*IncI1*/ST2 plasmids in healthy urban dogs in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(9), 5358-5362.
- Hall, L.M., Livermore, D.M., Gur, D., Akova, M. & Akalin, H.E. (1993). OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(8), 1637-1644.
- Harada, K., Morimoto, E., Kataoka, Y. & Takahashi, T. (2011). Clonal spread of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates among pups in two kennels. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53(1), 11.
- Hawkey, P.M. (2008). The growing burden of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(1), 1-9.
- Hawkey, P.M. & Jones, A.M. (2009). The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(1), 3-10.

- Heritage, J., M'Zali, F.H., Gascoyne-Binzi, D. & Hawkey, P.M. (1999). Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44(3), 309-318.
- Herzer, P.J., Inouye, S., Inouye, M. & Whittam, T.S. (1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172(11), 6175-6181.
- Heuer, H. & Smalla, K. (2007). Horizontal gene transfer between bacteria. *Environmental Biosafety Research*, 6(1-2), 3-13.
- Höltje, J.V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 181-203.
- Honoré, N., Nicolas, M.H. & Cole, S.T. (1986). Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 5(13), 3709-3714.
- Hordijk, J., Schoormans, A., Kwakernaak, M., Duim, B., Broens, E., Dierikx, C., Mevius, D. & Wagenaar, J.A. (2013). High prevalence of fecal carriage of extended spectrum  $\beta$ -lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs. *Frontiers in Microbiology*, 4, 242.
- Horii, T., Arakawa, Y., Ohta, M., Ichiyama, S., Wacharotayankun, R. & Kato, N. (1993). Plasmid-mediated AmpC-type beta-lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum beta-lactams, including moxalactam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(5), 984-990.
- Huber, H., Zweifel, C., Wittenbrink, M.M. & Stephan, R. (2013). ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Switzerland. *Veterinary Microbiology*, 162(2-4), 992-996.
- Jacoby, G.A. & Medeiros, A.A. (1991). More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(9), 1697-1704.
- Jacoby, G.A. & Tran, J. (1999). Sequence of the MIR-1 beta-lactamase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(7), 1759-1760.
- Jacoby, G.A. & Munoz-Price, L.S. (2005). The new beta-lactamases. *The New England Journal of Medicine*, 352(4), 380-391.
- Jacoby, G.A. (2006). Beta-lactamase nomenclature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1123-1129.
- Jacoby, G.A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161-182.
- Johnson, J.R. & Stell, A.L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 261-272.
- Johnson, J.R., Stell, A.L., Delavari, P., Murray, A.C., Kuskowski, M. & Gaastra, W. (2001a). Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(6), 897-906.

- Johnson, J.R., Delavari, P., Kuskowski, M. & Stell, A.L. (2001b). Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(1), 78-88.
- Johnson, J.R., Kaster, N., Kuskowski, M.A. & Ling, G.V. (2003). Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from dogs with urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 337-345.
- Johnson, T.J., Wannemuehler, Y.M., Johnson, S.J., Logue, C.M., White, D.G., Doetkott, C. & Nolan, L.K. (2007). Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1976-1983.
- Johnson, J.R., Miller, S., Johnston, B., Clabots, C. & Debroy, C. (2009). Sharing of *Escherichia coli* sequence type ST131 and other multidrug-resistant and Urovirulent *E. coli* strains among dogs and cats within a household. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11), 3721-3725.
- Källman, O., Fendukly, F., Karlsson, I. & Kronvall, G. (2003). Contribution of efflux to cefuroxime resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 35(8), 464-470.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P. & Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140.
- Kelly, B.G., Vespermann, A. & Bolton, D.J. (2009). The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), 951-968.
- Knox, J.R. (1995). Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(12), 2593-2601.
- Konaklieva, M.I. (2014). Molecular targets of  $\beta$ -lactam-based antimicrobials: beyond the usual suspects. *Antibiotics*, 3(2), 128-142.
- Kroemer, S., El Garch, F., Galland, D., Petit, J.L., Woehrle, F. & Boulouis, H.J. (2014). Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from infections in cats and dogs throughout Europe (2002-2009). *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 37(2), 97-108.
- Kruger, J.M. & Osborne, C.A. (1990). The role of viroses in feline lower urinary tract disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 4(2), 71-78.
- Kruger, J.M., Venta, P.J., Swenson, C.L., Syring, R., Gibbons-Burgener, S.N., Richter, M. & Maes, R.K. (2000). Prevalence of bovine herpesvirus-4 infection in cats in Central Michigan. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14(6), 593-597.
- Kvitko-White, H.L., Cook, A.K., Nabity, M.B., Zhang, S. & Lawhon, S.D. (2013). Evaluation of a catalase-based urine test for the detection of urinary tract infection in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(6), 1379-1384.
- Lartigue, M.F., Poirel, L., Poyart, C., Réglie-Poupet, H. & Nordmann, P. (2007). Ertapenem resistance of *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 13(2), 315-317.
- Lee, N., Yuen, K.Y. & Kumana, C.R. (2003). Clinical role of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. *Drugs*, 63(14), 1511-1524.

- Lee, J.H., Bae, I.K. & Lee, S.H. (2012). New definitions of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance. *Medicinal Research Reviews*, 32(1), 216-232.
- Lees, G.E. (1984). Epidemiology of naturally occurring feline bacterial urinary tract infections. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 14(3), 471-479.
- Lekcharoensuk, C., Osborne, C.A. & Lulich, J.P. (2001). Epidemiologic study of risk factors for lower urinary tract diseases in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(9), 1429-1435.
- Li, X., Plésiat, P. & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 337-418.
- Ling, G.V., Norris, C.R., Franti, C.E., Eisele, P.H., Johnson, D.L., Ruby, A.L. & Jang, S.S. (2001). Interrelations of organism prevalence, specimen collection method, and host age, sex, and breed among 8,354 canine urinary tract infections (1969-1995). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(4), 341-347.
- Litster, A., Moss, S.M., Honnery, M., Rees, B. & Trott, D.J. (2007). Prevalence of bacterial species in cats with clinical signs of lower urinary tract disease: recognition of *staphylococcus felis* as a possible feline urinary tract pathogen. *Veterinary Microbiology*, 121(1-2), 182-188.
- Litster, A., Thompson, M., Moss, S. & Trott, D. (2011). Feline bacterial urinary tract infections: an update on an evolving clinical problem. *The Veterinary Journal*, 187(1), 18-22.
- Livermore, D.M. (1987). Mechanisms of resistance to cephalosporin antibiotics. *Drugs*, 34(2), 64-88.
- Livermore, D.M. (1995). Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4), 557-584.
- Livermore, D.M. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical Infectious Diseases*, 36(1), 11-23.
- Livermore, D.M. & Woodford, N. (2006). The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*, 14(9), 413-420.
- Livermore, D.M., Cantón, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L. & Woodford, N. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), 165-174.
- Llarrull, L.I., Testero, S.A., Fisher, J.F. & Mobashery, S. (2010). The future of the  $\beta$ -lactams. *Current Opinion in Microbiology*, 13(5), 551-557.
- Lulich, J.P. & Osborne, C.A. (1996). Fungal infections of the feline lower urinary tract. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 26(2), 309-315.
- Lulich, J.P. & Osborne, C.A. (2004). Urine culture as a test for cure: why, when, and how? *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 34(4), 1027-1041.
- Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Baquero, F., Sousa, J.C. & Peixe, L. (2006). Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing Enterobacteriaceae strains containing the *aac(6')-Ib-cr* gene, which encodes an

aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(9), 3220-3221.

- Majiduddin F.K., Materon, I.C. & Palzkill, T.G. (2002). Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2), 127-137.
- Mantengoli, E., Luzzaro, F., Pecile, P., Cecconi, D., Cavallo, A., Attala, L., Bartoloni, A. & Rossolini, G.M. (2011). *Escherichia coli* ST131 producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases plus VIM-1 carbapenemase: further narrowing of treatment options. *Clinical Infectious Diseases*, 52(5), 690-691.
- Marques, C., Gama, L.T., Belas, A., Bergström, K., Beurlet, S., Briend-Marchal, A., Broens, E.M., Costa, M., Criel, D., Damborg, P., van Dijk, M.A., van Dongen, A.M., Dorsch, R., Espada, C.M., Gerber, B., Kritsepi-Konstantinou, M., Loncaric, I., Mion, D., Misic, D., Movilla, R., Overesch, G., Perreten, V., Roura, X., Steenbergen, J., Timofte, D., Wolf, G., Zaroni, R.G., Schmitt, S., Guardabassi, L. & Pomba, C. (2016). European multicenter study on antimicrobial resistance in bacteria isolated from companion animal urinary tract infections. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 213.
- Martínez-Martínez, L., Conejo, M.C., Pascual, A., Hernández-Allés, S., Ballesta, S., Ramírez De Arellano-Ramos, E., Benedí, V.J. & Perea, E.J. (2000). Activities of imipenem and cephalosporins against clonally related strains of *Escherichia coli* hyperproducing chromosomal beta-lactamase and showing altered porin profiles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9), 2534-2536.
- Martinez, J.L., Sánchez, M.B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A. & Alvarez-Ortega, C. (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), 430-449.
- Matsumoto, Y., Ikeda, F., Kamimura, T., Yokota, Y. & Mine, Y. (1988). Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(8), 1243-1246.
- Mayer-Roenne, B., Goldstein, R.E. & Erb, H.N. (2007). Urinary tract infections in cats with hyperthyroidism, diabetes mellitus and chronic kidney disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9(2), 124-132.
- Mendonça, N., Leitão, J., Manageiro, V., Ferreira, E. & Caniça, M. (2007). Spread of extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), 1946–1955.
- Mengin-Lecreulx, D. & Lemaitre, B. (2005). Structure and metabolism of peptidoglycan and molecular requirements allowing its detection by the *Drosophila* innate immune system. *Journal of Endotoxin Research*, 11(2), 105-111.
- Meyer, E., Gastmeier, P., Kola, A. & Schwab, F. (2012). Pet animals and foreign travel are risk factors for colonisation with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Infection*, 40(6), 685-687.
- Miller, E.L. (2002). The penicillins: a review and update. *Journal of Midwifery & Women's Health*, 47(6), 426-434.
- Moosdeen, F., Williams, J.D. & Yamabe, S. (1988). Antibacterial characteristics of YTR 830, a sulfone beta-lactamase inhibitor, compared with those of clavulanic acid and sulbactam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(6), 925-927.

- Moriel, D.G., Rosini, R., Seib, K.L., Serino, L., Pizza, M. & Rappuoli, R. (2012). *Escherichia coli*: great diversity around a common core. *mBio American Society for Microbiology*, 3(3), e00118-12.
- Morley, P.S., Apley, M.D., Besser, T.E., Burney, D.P., Fedorka-Cray, P.J., Papich, M.G., Traub-Dargatz, J.L. & Weese, J.S. (2005). Antimicrobial drug use in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(4), 617-629.
- Morris D., Boyle, F., Ludden, C., Condon, I., Hale, J., O'Connell, N., Power, L., Boo, T.W., Dhanji, H., Lavalley, C., Woodford, N. & Cormican, M. (2011). Production of KPC-2 carbapenemase by an *Escherichia coli* clinical isolate belonging to the international ST131 clone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), 4935-4936.
- Moxley, R. (2013). Enterobacteriaceae: *Escherichia*. In D.S. McVey, M. Kennedy & M.M. Chengappa (Eds.), *Veterinary Microbiology*. (3rd ed.). (pp. 62-74). Iowa, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Mulvey, M.R. & Simor, A.E. (2009). Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? *Canadian Medical Association Journal*, 180(4), 408-415.
- Murphy, C., Reid-Smith, R.J., Prescott, J.F., Bonnett, B.N., Poppe, C., Boerlin, P., Weese, J.S., Janecko, N. & McEwen, S.A. (2009). Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: A preliminary study. *The Canadian Veterinary Journal*, 50(10), 1047-1053.
- Naas, T., Cuzon, G., Gaillot, O., Courcol, R. & Nordmann, P. (2011). When carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC meets *Escherichia coli* ST131 in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), 4933–4934.
- Nanninga, N. (1998). Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 110-129.
- Nataro, J.P. & Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142-201.
- Nathwani, D. & Wood, M.J. (1993). Penicillins. A current review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs*, 45(6), 866-894.
- Nebbia, P., Odore, R., Tramuta, C., Borrelli, A., Malabaila, A., Crocilla, C. & Robino, P. (2016). Antimicrobial susceptibility pattern of gram negative bacteria isolated from feline urinary tract infections (UTIs): a retrospective study from 2011 to 2014. *Journal of Veterinary Sciences*, 17(1), 47-52.
- Neu, H.C. (1986).  $\beta$ -Lactam antibiotics: structural relationships affecting in vitro activity and pharmacologic properties. *Clinical Infectious Diseases*, 8(3), 237-259.
- Nicolas-Chanoine, M.H. (1997). Inhibitor-resistant beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40(1), 1-3.
- Nicolas-Chanoine, M.H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M.P., Caniça, M.M., Park, Y.J., Lavigne, J.P., Pitout, J. & Johnson, J.R. (2008). Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(2), 273-281.
- Nikaido, H. (1992). Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Molecular Microbiology*, 6(4), 435-442.



- Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 119-146.
- Normand, E.H., Gibson, N.R., Reid, S.W., Carmichael, S., Taylor, D.J. (2000). Antimicrobial-resistance trends in bacterial isolates from companion-animal community practice in the UK. *Preventive Veterinary Medicine*, 46(4), 267-278.
- Normark, B.H. & Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 252(2), 91-106.
- Norris, C.R., Williams, B.J., Ling, G.V., Franti, C.E., Johnson, D.L. & Ruby, A.L. (2000). Recurrent and persistent urinary tract infections in dogs: 383 cases (1969-1995). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 36(6), 484-492.
- Novais, A., Cantón, R., Valverde, A., Machado, E., Galán, J.C., Peixe, L., Carattoli, A., Baquero, F. & Coque, T.M. (2006). Dissemination and persistence of blaCTX-M-9 are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-alpha, and IncFI groups. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(8), 2741-2750.
- Ochman H., Whittam, T.S., Caugant, D.A. & Selander, R.K. (1983). Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. *Journal of General Microbiology*, 129(9), 2715-2726.
- O'Keefe, A., Hutton, T.A., Schifferli, D.M, & Rankin, S.C. (2010). First detection of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* urinary tract isolates from dogs and cats in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(8), 3489-3492.
- Olin, S.J. & Bartges, J.W. (2015). Urinary tract infections: treatment/comparative therapeutics. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 45(4), 721-746.
- Orenstein, R. & Wong, E.S. (1999). Urinary tract infections in adults. *American Family Physician*, 59(5), 1225-1234.
- Osugui, L., Pestana de Castro, A.F., Iovine, R., Irino, K. & Carvalho, V.M. (2014). Virulence genotypes, antibiotic resistance and the phylogenetic background of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections of dogs and cats in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 171(1-2), 242-247.
- Oteo, J., Cercenado, E., Cuevas, O., Bautista, V., Delgado-Iribarren, A., Orden, B., Pérez-Vázquez, M., García-Cobos, S. & Campos, J. (2010). AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*: emergence of CMY-2-producing virulent phylogroup D isolates belonging mainly to STs 57, 115, 354, 393, and 420, and phylogroup B2 isolates belonging to the international clone O25b-ST131. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67(3), 270-276.
- Pagès, J.M. & Amaral, L. (2009). Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794(5), 826-833.
- Paladino, J.A., Sunderlin, J.L., Singer, M.E., Adelman, M.H. & Schentag, J.J. (2008). Influence of extended-spectrum beta-lactams on gram-negative bacterial resistance. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 65(12), 1154-1159.
- Papanicolaou, G.A., Medeiros, A.A. & Jacoby, G.A. (1990). Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams

- in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(11), 2200-2209.
- Paterson, D.L. & Bonomo, R.A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657-686.
- Paterson, D.L. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *American Journal of Medicine*, 119(6), 20-28.
- Peirano, G. & Pitout, J.D. (2010). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 316-321.
- Penders, J. & Stobberingh, E.E. (2008). Antibiotic resistance of motile aeromonads in indoor catfish and eel farms in the southern part of the Netherlands. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(3), 261-265.
- Penders, J., Stobberingh, E.E., Savelkoul, P.H. & Wolfs, P.F. (2013). The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 4, 87.
- Pérez-Pérez, F.J. & Hanson, N.D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), 2153-2162.
- Pfeifer, Y., Cullik, A. & Witte, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(6), 371-379.
- Philippon, A., Arlet, G. & Jacoby, G.A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(1), 1-11.
- Picard, B., Garcia, J.S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J. & Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and Immunity*, 67(2), 546-553.
- Pitout, J.D., Nordmann, P., Laupland, K.B. & Poirel, L. (2005). Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 52-59.
- Pitout, J.D. & Laupland, K.B. (2008). Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(3), 159-166.
- Platell, J.L., Johnson, J.R., Cobbold, R.N. & Trott, D.J. (2011). Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Veterinary Microbiology*, 153(1-2), 99-108.
- Poirel, L., Girlich, D., Naas, T. & Nordmann, P. (2001). OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10  $\beta$ -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(2), 447-453.
- Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V. & Nordmann, P. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 15-22.
- Pomba, C., da Fonseca, J.D., Baptista, B.C., Correia, J.D. & Martínez-Martínez, L. (2009a). Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-

producing clone harboring the qnrB2 and aac(6')-Ib-cr genes in a dog. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(1), 327-328.

- Pomba, C., Delgado, M., Ferreira, M., Pereira, S., Baptista, B. & Correia, J. (2009b). Etiology of canine and feline lower urinary tract infections and surveillance study of antimicrobial resistance in Lisbon, Portugal. *19<sup>th</sup> Congress of the European College of Veterinary Internal Medicine – Companion Animals, 8-10 September 2009, Porto, Portugal*.
- Pomba, C., López-Cerero, L., Bellido, M., Serrano, L., Belas, A., Couto, N., Cavaco-Silva, P., Rodríguez-Baño, J. & Pascual A. (2014). Within-lineage variability of ST131 *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in the south of Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(1), 271-273.
- Pomba, C., Rantala, M., Greko, C., Baptiste, K.E., Catry, B., van Duijkeren E., Mateus, A., Moreno, M.A., Pyörälä, S., Ružauskas, M., Sanders, P., Teale, C., Threlfall, E.J., Kunsagi, Z., Torren-Edo, J., Jukes, H. & Törneke, K. (2016). Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, PMID: 27999066.
- Poole, K. (2004). Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(17), 2200-2223.
- Pressler, B.M., Vaden, S.L., Lane, I.F., Cowgill, L.D. & Dye, J.A. (2003). *Candida spp.* urinary tract infections in 13 dogs and seven cats: predisposing factors, treatment, and outcome. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 39(3), 263-270.
- Pressler, B. & Bartges, J.W. (2010). Urinary tract infections. In: S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (7th Ed.). (pp. 2036-2046). St. Louis Missouri: Elsevier Saunders.
- Reading, C. & Cole, M. (1977). Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11(5), 852-857.
- Reference Laboratory for *Escherichia coli* (2004). *Pathogenic E. coli - Ecology of pathogenic E. coli*. Acedido em Jun. 20, 2016, disponível em <http://www.ecl-lab.ca/en/ecoli/index.asp>
- Rice, L.B. (2006). Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *American Journal of Medicine*, 119(6), 11-19.
- Richmond, M.H. & Sykes, R.B. (1973). The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Advances in Microbial Physiology*, 9, 31-88.
- Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A. & Blázquez, J. (2013). Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 293-297.
- Rodriguez-Villalobos, H., Bogaerts, P., Berhin, C., Bauraing, C., Deplano, A., Montesinos, I., de Mendonça, R., Jans, B. & Glupczynski, Y. (2011). Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae of clinical interest: results of a nationwide survey in Belgian hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(1), 37-47.
- Rogers, B.A., Sidjabat, H.E. & Paterson, D.L. (2011). *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(1), 1-14.

- Rolain, J.M. & Raoult, D. (2005). Genome comparison analysis of molecular mechanisms of resistance to antibiotics in the *Rickettsia* genus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1063, 222-230.
- Rossolini, G.M. & Docquier, J.D. (2006). New beta-lactamases: a paradigm for the rapid response of bacterial evolution in the clinical setting. *Future Microbiology*, 1(3), 295-308.
- Rossolini, G.M., D'Andrea, M.M. & Mugnaioli, C. (2008). The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(1), 33-41.
- Russo, T.A. & Johnson J.R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1753-1754.
- Rzewuska, M., Czopowicz, M., Kizerwetter-Uwida, M., Chrobak, D., Baszczak, B. & Binek, M. (2015). Multidrug resistance in *Escherichia coli* strains isolated from infections in dogs and cats in Poland (2007–2013). *The Scientific World Journal*, 2015(2015), 408205.
- Sabaté, M., Miró, E., Navarro, F., Vergés, C., Aliaga, R., Mirelis, B. & Prats, G. (2002). Beta-lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(6), 989-997.
- Saini, A & Bansal, R. (2012). Insights on the structural characteristics of NDM-1: the journey so far. *Advances in Biological Chemistry*, 2, 323-334.
- Saladin, M., Cao, V.T.B., Lambert, T., Donay, J.L., Herrmann, J.L., Ould-Hocine, Z., Verdet, C., Delisle, F., Philippon, A. & Arlet, G. (2002). Diversity of CTX-M  $\beta$ -lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 209(2), 161-168.
- Samaha-Kfoury, J.N. & Araj, G.F. (2003). Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta lactamases. *British Medical Journal*, 327(7425), 1209-1213.
- Sanchez, S., McCrackin Stevenson, M.A., Hudson, C.R., Maier, M., Buffington, T., Dam, Q. & Maurer, J.J. (2002). Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10), 3586-3595.
- Sandiumenge, A., Diaz, E., Rodriguez, A., Vidaur, L., Canadell, L., Olona, M., Rue, M. & Rello, J. (2006). Impact of diversity of antibiotic use on the development of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(6), 1197-1204.
- Sasirekha, B. (2013). Prevalence of ESBL, AmpC  $\beta$ -lactamases and MRSA among uropathogens and its antibiograma. *EXCLI Journal*, 12, 81–88.
- Sawai, T., Mitsuhashi, S. & Yamagishi, S. (1968). Drug resistance of enteric bacteria XIV. Comparison of  $\beta$ -Lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to  $\alpha$ -aminobenzylpenicillin. *Microbiology and Immunology*, 12(4), 423-434.
- Saxon, A., Hassner, A., Swabb, E.A., Wheeler, B. & Adkinson, N.F.J. (1984). Lack of cross-reactivity between aztreonam, a monobactam antibiotic, and penicillin in penicillin-allergic subjects. *The Journal of Infectious Diseases*, 149(1), 16-22.

- Scheffers, D.J. & Pinho, M.G. (2005). Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), 585-607.
- Schink, A.K., Kadlec, K. & Schwarz, S. (2011). Analysis of *bla*(CTX-M)-carrying plasmids from *Escherichia coli* isolates collected in the BfT-GermVet study. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), 7142-7146.
- Schink, A.K., Kadlec, K., Kaspar, H., Mankertz, J. & Schwarz, S. (2013). Analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates collected in the GERM-Vet monitoring programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(8), 1741-1749.
- Schmiedel, J., Falgenhauer, L., Domann, E., Bauerfeind, R., Prenger-Berninghoff, E., Can Imirzalioglu, C. & Chakraborty, T. (2014). Multiresistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. *BMC Microbiology*, 14, 187.
- Schmieder, R. & Edwards, R. (2012). Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiology*, 7(1), 73-89.
- Seguin, M.A., Vaden, S.L., Altier, C., Stone, E. & Levine, J.F. (2003). Persistent urinary tract infections and reinfections in 100 dogs (1989-1999). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(5), 622-631.
- Selander, R.K., Musser, J.M., Caugant, D.A., Gilmour, M.N. & Whittam, T.S. (1987). Population genetics of pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 3(1), 1-7.
- Shaheen, B.W., Nayak, R., Foley, S.L., Kweon, O., Deck, J., Park, M., Rafii, F. & Boothe, D.M. (2011). Molecular characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins in clinical *Escherichia coli* isolates from companion animals in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12), 5666-5675.
- Sidjabat, H.E., Townsend, K.M., Hanson, N.D., Bell, J.M., Stokes, H.W., Gobius, K.S., Moss, S.M. & Trott, D.J. (2006). Identification of *bla*(CMY-7) and associated plasmid-mediated resistance genes in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs at a veterinary teaching hospital in Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(5), 840-848.
- Sidjabat, H.E., Paterson, D.L., Qureshi, Z.A., Adams-Haduch, J.M., O'Keefe, A., Pascual, A., Rodríguez-Baño, J. & Doi Y. (2009). Clinical features and molecular epidemiology of CMY-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases*, 48(6), 739-744.
- Simões, R.R., Poirel, L., Da Costa, P.M. & Nordmann, P. (2010). Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), 110-112.
- Siqueira, A.K., Ribeiro, M.G., Leite, D.S., Tiba, M.R., Moura, C., Lopes, M.D., Prestes, N.C., Salerno, T. & Silva, A.V. (2009). Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. *Research in Veterinary Science*, 86(2), 206-210.
- Smee, N., Loyd, K. & Grauer, G. (2013a). UTIs in small animal patients: part 1: etiology and pathogenesis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 49(1), 1-7.
- Smee, N., Loyd, K. & Grauer, G. F. (2013b). UTIs in small animal patients: part 2: diagnosis, treatment, and complications. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 49(2), 83-94.

- Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Herman, L., Haesebrouck, F. & Butaye, P. (2010). Broad-spectrum  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(3), 295-316.
- Sørensen, T.M., Jensen, A.B., Damborg, P., Bjørnvad, C.R., Guardabassi, L. & Jessen, L.R. (2016). Evaluation of different sampling methods and criteria for diagnosing canine urinary tract infection by quantitative bacterial culture. *The Veterinary Journal*, 216(2016), 168-173.
- Spratt, B.G. (1994). Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science*, 264(5157), 388-393.
- Steen, S.I. & Webb, P.J. (2007). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing bacteria isolated from companion animals. *Veterinary Record*, 161, 703.
- Stegemann, M.R., Passmore, C.A., Sherington, J., Lindeman, C.J., Papp, G., Weigel, D.J. & Skogerboe, L. (2006). Antimicrobial activity and spectrum of cefovecin, a new extended-spectrum cephalosporin, against pathogens collected from dogs and cats in Europe and North America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(7), 2286-2292.
- Suárez, C. & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116-129.
- Sykes, R.B. & Matthew, M. (1976). The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2(2), 115-157.
- Sykes, J.E. & Westropp, J.L. (2014). Bacterial infections of the genitourinary tract. In J.E. Sykes, *Canine and feline infectious diseases*. (pp.871-885). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Tamang, M.D., Nam, H.M., Jang, G.C., Kim, S.R., Chae, M.H., Jung, S.C., Byun, J.W., Park, Y.H. & Lim, S.K. (2012). Molecular characterization of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from stray dogs in South Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), 2705-2712.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B. & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 207-217.
- Tenover, F.C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Medicine*, 119(6), 3-10.
- Teshager, T., Domínguez, L., Moreno, M.A., Saénz, Y., Torres, C. & Cardeñosa, S. (2000). Isolation of an SHV-12 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain from a dog with recurrent urinary tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12), 3483-3484.
- Theuretzbacher, U. (2011). Resistance drives antibacterial drug development. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(5), 433-438.
- Thomas, C.M. & Nielsen, K.M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 711-721.

- Thompson, R.L. (1987). Cephalosporin, carbapenem, and monobactam antibiotics. *Mayo Clinic Proceedings*, 62(9), 821-834.
- Timofte, D., Dandrieux, J., Wattret, A., Fick, J. & Williams, N.J. (2011). Detection of extended-spectrum-beta-lactamase-positive *Escherichia coli* in bile isolates from two dogs with bacterial cholangiohepatitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(9), 3411-3414.
- Timofte, D., Maciucă, I.E., Kemmett, K., Wattret, A. & Williams, N.J. (2014). Detection of the human-pandemic *Escherichia coli* B2-O25b-ST131 in UK dogs. *Veterinary Record*, 174(14), 352.
- Tomasz, A. (1979). The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 33, 113-137.
- Tramuta, C., Nucera, D., Robino, P., Salvarani, S. & Nebbia, P. (2011). Virulence factors and genetic variability of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Italy. *Journal of Veterinary Science*, 12(1), 49-55.
- Turner, P.J. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Infectious Diseases*, 41(1), 273-275.
- Turner, P.J. (2008). Meropenem activity against European isolates: report on the MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) 2006 results. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60(2), 185-192.
- Vimont, S., Boyd, A., Bleibtreu, A., Bens, M., Goujon, J.M., Garry, L., Clermont, O., Denamur, E., Arlet, G. & Vandewalle, A. (2012). The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone O25b: H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. *PLoS One*, 7(9), e46547.
- von Wintersdorff, C.J., Penders, J., van Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., van Alphen, L.B., Savelkoul, P.H. & Wolfs, P.F. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7, 173. doi: 10.3389/fmicb.2016.00173
- Wagner, S., Gally, D.L. & Argyle, S. (2014). Multidrug-resistant *Escherichia coli* from canine urinary tract infections tend to have commensal phylotypes, lower prevalence of virulence determinants and ampC-replicons. *Veterinary Microbiology*, 169(3-4), 171-178.
- Walther-Rasmussen, J. & Høiby, N. (2006). OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), 373-383.
- Weese, J.S. (2008). Antimicrobial resistance in companion animals. *Animal Health Research Reviews*, 9(2), 169-176.
- Weese, J.S., Blondeau, J.M., Boothe, D., Breitschwerdt, E.B., Guardabassi, L., Hillier, A., Lloyd, D.H., Papich, M.G., Rankin, S.C., Turnidge, J.D. & Sykes, J.E. (2011). Antimicrobial use guidelines for treatment of urinary tract disease in dogs and cats: antimicrobial guidelines working group of the international society for companion animal infectious diseases. *Veterinary Medicine International*, 2011, 263768.
- Weldhagen, G.F., Poirel, L. & Nordmann, P. (2003). Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), 2385-2392.

- Wellington, E.M., Boxall, A.B., Cross, P., Feil, E.J., Gaze, W.H., Hawkey, P.M., Johnson-Rollings, A.S., Jones, D.L., Lee, N.M., Otten, W., Thomas, C.M. & Williams, A.P. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(2), 155-165.
- Whittam, T.S., Ochman, H. & Selander, R.K. (1987). Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(6), 1751-1755.
- Wilke, M.S., Lovering, A.L. & Strynadka, N.C. (2005). Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 8(5), 525-533.
- Witte, W. (2000). Selective pressure by antibiotic use in livestock. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16(1), 19-24.
- Woodford, N., Fagan, E.J. & Ellington, M.J. (2006). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(1), 154-155.
- Woodford, N. & Ellington, M.J. (2007). The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(1), 5-18.
- Woodford, N., Carattoli, A., Karisik, E., Underwood, A., Ellington, M.J. & Livermore, D.M. (2009). Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10), 4472-4482.
- Woodford, N., Turton, J.F. & Livermore, D.M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 736-755.
- World Health Organization (2012). *Critically important antimicrobials for human medicine - 3rd Revision 2011*. Geneva: WHO, AGISAR.
- World Health Organization (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Geneva: WHO.
- Wright, A.J. (1999). The penicillins. *Mayo Clinic Proceedings*, 74(3), 290-307.
- Yamamoto, S. (2007). Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 13(2), 68-73.
- Yim, G., Wang, H.H. & Davies, J. (2006). The truth about antibiotics. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2-3), 163-170.



## 9 – Anexos

### Anexo 1 – Resumo aceite para Comunicação em Poster no XII Congresso do Hospital Veterinário Montenegro, 2016, Santa Maria da Feira, Porto

#### Resistance to amoxicillin/clavulanate and thirdgeneration cephalosporins in uropathogenic *E. coli* from companion animals

A. Franco<sup>1</sup>, A. Belas<sup>1</sup>, C. Marques<sup>1</sup>, L. Telo da Gama<sup>1</sup>, C. Pomba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas, CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

**Introduction:** *Escherichia coli* is the most common pathogenic bacteria isolated from dogs and cats with urinary tract infection (UTI). These bacteria can be divided into four main phylogenetic groups (A, B1, B2 and D) [1], being B2 and D the virulent phylogroups [2].  $\beta$ -lactams are frequently used in veterinary and human medicine. Thus the increase in antimicrobial resistance against amoxicillin/clavulanate and third-generation cephalosporins is a great concern.

**Objectives:** This study aimed to characterize the phylogenetic groups and antimicrobial resistance mechanisms to amoxicillin/clavulanate and third-generation cephalosporins of *E. coli* isolated from companion animals with UTI. Furthermore, it aimed to determine the temporal trends of resistance over a period of 16 years.

**Methods:** Between 1999 to 2014, antimicrobial susceptibility testing was conducted in 417 *E. coli* isolated from dogs and cats with UTI. Clinical breakpoints were applied according to CLSI guidelines. A total of 305 *E. coli* were recovered from storage in 20% glycerol -80°C and further characterized. Phylogenetic groups were determined by PCR [1]. Amoxicillin/clavulanate resistant isolates were screened by PCR for ESBL (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>) and third-generation cephalosporin resistant isolates were screened for the presence of ESBL (*bla*<sub>CTX-M</sub>) and pAMPc (*bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>CIT</sub>, *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>MIR</sub>, *bla*<sub>ACT</sub>). Statistical analysis of antimicrobial resistance temporal trends were determined by logistic regression model of SAS.

**Results:** Considering the 1999-2014 time period, 17.2% (n=71/413) and 12.3% (51/415) were resistant to amoxicillin/clavulanate and third-generation cephalosporin, respectively. Yet, a significant increase in amoxicillin/clavulanate (p<0.001) and third-generation cephalosporins (p<0.001) resistance was detected over time. Phylogroup B2 was the most frequent (57.0%, n=174/305) followed by A (15.7%, n=48/305), D (13.8%, n=42/305) and B1 (13.4%, n=41/305). Among amoxicillin/clavulanic resistant *E. coli*, phylogroup D, B2 and A were the most common. The presence of *bla*<sub>TEM</sub> (56.4%, n=22/39) and *bla*<sub>OXA-1</sub> (18.0%, n=7/39) were detected in amoxicillin/clavulanate resistant isolates. Third-generation cephalosporin resistance was

mainly due to the presence of *bla*<sub>CMY</sub> in *E. coli* phylogroup D and *bla*<sub>CTX-M</sub> in *E. coli* phylogroup B2 and A.

**Conclusions:** These results show a significant increase in *E. coli* amoxicillin/clavulanic and third-generation cephalosporins resistance over time. This is a concerning fact especially considering that these are critical antimicrobials for humans. Moreover, amoxicillin/clavulanic and third-generation cephalosporin resistance was frequently associated with virulent phylogroup B2 and D. This raises great concerns regarding the role of companion animals as reservoirs of resistant and virulent *E. coli*.

**References:**

1. Doumith, M., Day, M.J., Hope, R., Wain, J. & Woodford, N. (2012). Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9), 3108-3110.
2. Johnson, J.R., Kaster, N., Kuskowski, M.A. & Ling, G.V. (2003). Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from dogs with urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 337-345.

## Anexo 2 – Resumo aceite para Comunicação em Poster no XII Congresso do Hospital Veterinário Montenegro, 2016, Santa Maria da Feira, Porto

### Rational empirical antimicrobial therapy (FRAT) for UTI in companion animals

C. Salas<sup>1</sup>, C. Marques<sup>2</sup>, A. Belas<sup>2</sup>, N. Couto<sup>2</sup>, A. Franco<sup>2</sup>, C. Aboim<sup>2</sup>, L. Telo da Gama<sup>2</sup>, C. Pomba<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Veterinário D. Sancho I, Almada, Portugal

<sup>2</sup>Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas, CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

**Introduction:** Urinary tract infections (UTI) are frequently diagnosed in companion animals. The choice of the appropriate antimicrobial should rely on susceptibility testing, yet it is often administered empirically. To help guide human physicians, Blondeau and Tillotson [1] developed the Formula to help select Rational Antimicrobial Therapy (FRAT). This formula takes into consideration both etiological and antimicrobial susceptibility data [1]. The FRAT allows the determination of the impact factor that reflects the probability that a pathogen randomly selected from the study population is susceptible to a particular antimicrobial [2].

**Objective:** The aim of this study was to characterize the UTI etiology in dogs and cats and to apply the FRAT.

**Methods:** Culture and susceptibility data from positive urine cultures conducted from companion animals at the Laboratory of Resistance to Antimicrobials and Biocides from the Faculty of Veterinary Medicine – University of Lisbon were retrospectively analyzed. Data from 1999 to 2014 was used to estimate and compare the prevalence of common bacterial uropathogens between dogs and cats. The Fisher exact test was used with an alpha value of 0.05. Susceptibility data was conducted by disk diffusion method and clinical breakpoints were applied according to CLSI. Impact factor for amoxicillin/clavulanate, trimethoprim/sulphamethoxazol, third-generation cephalosporins and second generation fluoroquinolones was calculated using the FRAT [1] considering 2007-2014 time period. Only bacteria species which were isolated in more than 2,5% of positive urine cultures were included in FRAT calculation.

**Results:** Both in dogs (45.43%, n=323/711) and cats (38.04%, n=97/255) *E. coli* was the most frequently isolated bacteria. The frequency of *Enterococcus* spp. was significantly higher in cats ( $p<0.001$ ) and *Proteus* spp. was significantly higher in dogs ( $p<0.001$ ). Although *Staphylococcus* spp. overall did not differ significantly between dogs and cats ( $p=0.083$ ), *S. pseudintermedius* was more common in dogs and *S. felis* and *S. epidermidis* in cats ( $p<0.001$ ). In dogs and cats antimicrobial susceptibility from *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. were included in the FRAT formula. *Proteus* spp. was only considered in dogs. The impact factors for all the antimicrobials

considered were lower than 80%. Amoxicillin/clavulanate and trimethoprim/sulphamethoxazol had an impact factor close to 60% both in cats and dogs. Third-generation cephalosporins and second-generation fluoroquinolones impact factor was around 40% and 70% in cats and dogs, respectively.

**Conclusions:** As seen in other studies, *E. coli* was the most common bacteria in companion animals with UTI [2]. This study also shows an overall low impact factor for all the antimicrobials frequently used in empirical treatment. Impact factors may be slightly underestimated considering the fact that complicated UTIs tend to be sent for susceptibility testing analysis more often than simple uncomplicated UTIs. The lower impact factor to third generation-cephalosporins and second generation fluoroquinolones in cats is likely due to the higher frequency of *Enterococcus* spp., since this genus is intrinsically resistant to third-generation cephalosporins and have high resistance to second-generation fluoroquinolones (data not shown). These results reinforce the need for susceptibility testing to guide antimicrobial treatment. Furthermore, amoxicillin/clavulanate and trimethoprim/sulphamethoxazol should continue to be considered the first line treatment.

**References:**

1. Blondeau, J.M. & Tillotson, G.S. (1999). Formula to help select rational antimicrobial therapy (FRAT): its application to community- and hospital-acquired urinary tract infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12(2), 145–150.
2. Ball, K.R., Rubin, J.E., Chirino-Trejo, M. & Dowling P. M. (2008). Antimicrobial resistance and prevalence of canine uropathogens at the Western College of Veterinary Medicine Veterinary Teaching Hospital, 2002–2007. *Canadian Veterinary Journal*, 49(10): 985–990.

### **Anexo 3 – Resumo aceite para Comunicação Livre no XII Congresso do Hospital Veterinário Montenegro, 2016, Santa Maria da Feira, Porto**

#### **Emergence of major international high-risk clones in companion animals with urinary tract infection: 16 years retrospective study in Portugal**

C. Marques<sup>1</sup>, A. Belas<sup>1</sup>, N. Couto<sup>1</sup>, A. Franco<sup>1</sup>, C. Aboim<sup>1</sup>, L. Telo da Gama<sup>1</sup>, C. Pomba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas, CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Urinary tract infections caused by multidrug resistant bacteria are being increasingly reported in companion animals<sup>1</sup>. Antimicrobial choice should account for the most likely causative agent and local susceptibility patterns<sup>2</sup>. Thus, updated information on antimicrobial susceptibility is crucial. Furthermore, since companion animals with UTI are generally treated at home, their possible role in the spread of important bacterial clones to humans is a major concern.

This retrospective study first goal was to determine antimicrobial resistance temporal trends over 16 years in bacteria isolated from companion animals with UTI in Portugal. Also, it aimed to evaluate the clonal lineages of bacteria harboring critical antimicrobial resistance mechanisms.

Susceptibility testing was conducted by disk diffusion method in 966 bacteria isolated from companion animal positive urine cultures (1999-2014). Detection of resistance mechanism was conducted by PCR for: third generation cephalosporin resistance (3GC) ESBL/pAMPc in Gram negatives, *mecA* in methicillin resistant staphylococci (MRS), *aac(6')-leaph(2'')-Ia* and *aph(2'')-1d* in high level gentamicin resistant (HLGR) *enterococci*. The clonal lineages of resistant bacteria were determined by MLST. *Staphylococci* were also typed by SCC*mec*. *E. coli* ST131 O25b serotyping was conducted by PCR. Statistical analysis of antimicrobial resistance temporal trends were determined by logistic regression model of SAS.

*E. coli* (43.4%, n=419/966) was the most frequently isolated bacteria followed by *Proteus mirabilis* (16.0%, n=155/966), *Staphylococcus* spp. (13.2%, n=128/966) and *Enterococcus* spp. (6.8%, n=66/966). Gram negative resistance to amoxicillin/clavulanate, 3GC, fluoroquinolones and trimethoprim/sulphamethoxazole had a statistically significant increase over time (p<0.0001, p<0.0001, p<0.0001 and P=0.0095, respectively). An increasing temporal trend in MDR Gram negative bacteria was also detected (p<0.0001). 3GC-resistance was mainly due to the presence of *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in *Klebsiella*, *bla*<sub>CMY-2</sub> in *P. mirabilis* and to *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, -32 and *CMY-2* in *E. coli*. These resistance mechanisms are known to be highly important in human medicine. 3GC-resistant *E. coli* lineages showed a marked temporal variation, with the emergence of two major uropathogenic lineages associated with UTI in humans<sup>3-4</sup>, namely: O25b:H4-B2-ST131 (14.8%, n=4/27) first detected in 2004 and ST648 (37.0%, n=10/27) first

detected in 2010. All *Klebsiella pneumoniae* 3GC-resistant were multi-drug resistant and also belonged mainly to the international MDR zoonotic *K. pneumoniae* lineage ST15 (n=10/13). MRS due to the presence of *mecA* gene was detected in 8.6% (n=11/128) *Staphylococcus* spp.. MRS. *pseudintermedius* and *S. epidermidis* belonged to ST71-II-III, ST196-V and to ST2-nt, ST20-nt, ST23-IV, ST35-nt, respectively. One ST5-VI and one ST105-II MRS. *aureus* were also isolated. HLGR was found in *Enterococcus faecalis* (13.2%, n=7/53) harboring *aac(6')-leaph(2'')-Ia*, and *Enterococcus faecium* (n=2/9) harboring *aac(6')-leaph(2'')-Ia* or *aph(2'')-1d*. Almost all *E. faecium* were ampicillin resistant (n=8/9). Two HLGR high risk *E. faecalis* lineages, ST6 (CC2) and ST16, were found. *E. faecalis* clonal-complex 2 (CC2) is particularly important since it is a human hospital-adapted complex. Two resistant *E. faecium* were also found to belong to human hospital-adapted clonal-complex, namely ST19 (CC17) and ST137 (CC17). This study shows increasing temporal trends in antimicrobial resistance in uropathogens from companion animals. The clear emergence of major international high-risk lineages harboring critical resistance mechanisms in companion animals should not be neglected and raises great public-health concerns. Measures should be taken during active UTI in companion animals to minimize the spread of such bacteria.

1. European Medicine Agency. Reflection paper on the risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2015/01/WC500181642.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/01/WC500181642.pdf).
2. Weese et al. 2011. Antimicrobial use guidelines for treatment of urinary tract disease in dogs and cats: antimicrobial guidelines working group of the international society for companion animal infectious diseases. *Vet Med Int.* 2011:263768.
3. Johnson J.R. et al. 2010. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clin Infect Dis.* 51(3):286-94.
4. Ewers C. et al. 2014. CTX-M-15-D-ST648 *Escherichia coli* from companion animals and horses: another pandemic clone combining multiresistance and extraintestinal virulence? *J Antimicrob Chemother.* 69(5):1224-30.

**Anexo 4 – Resumo aceite para Comunicação em Poster no 26<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases - 2016, Amesterdão, Holanda**

**Spread of major human ESBL and AmpC-producing *Escherichia coli* lineages in companion animals with UTI over 17 years in Portugal**

A. Belas<sup>1</sup>, C. Marques<sup>1</sup>, A. Franco<sup>1</sup>, C. Pomba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas, CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

**Background:** The aim of this study was to detect and characterize the *E. coli* lineages responsible for the introduction and dissemination of third-generation cephalosporin (3GC)-resistance among *E. coli* causing urinary tract infection in companion animals.

**Material/methods:** From January 1999 to April 2015, the antimicrobial susceptibility of 324 uropathogenic *E. coli* isolated from dogs and cats was studied by the disk diffusion method. The phylogenetic groups were determined for all strains. 3GC-resistant *E. coli* strains were typed for MLST, the ST131 lineage was sub-typed for O16, O25b, H30, H30-Rx and for 8 pathogenicity islands markers and *papEF*, *sfaDE*, *afaBC*, *hlyA*, *cnf1*, *iucD*, *usp*, *ecpA* virulence genes

**Results:** *E. coli* isolates were resistant to ampicillin 48% (n=154/324), 14.0% (n=45/324) to amoxicillin/clavulanate and 9.6% (n=31/324) to 3GC. The *E. coli* resistance rate against antimicrobials other than beta-lactams was: 30% (n=96/324) to trimethoprim/sulfamethoxazole, 25% (n=81/324) to fluoroquinolone, 10.5% (n=34/324) to aminoglycosides and 4.0% (n=13/324) to nitrofurantoin. All isolates were susceptible to carbapenems. Companion animal *E. coli* isolates belonged mainly to B2 filogenetic group (57.4%, n=186/324) followed by group-A (15.1%, n=49/324), group-D (13.9%, n=45/324) and group-B1 (13.6%, n=44/324). 3GC-resistant *E. coli* phylogroup-B2 and D strains had pathogenicity profiles and virulence-associated genes belonged mostly to *I*<sub>536</sub>*II*<sub>J96</sub>*IV*<sub>536</sub>*II*<sub>CFT0T3</sub>, *I*<sub>536</sub>*II*<sub>J96</sub>*IV*<sub>536</sub>*I*<sub>CFT0T3</sub>*II*<sub>536</sub>, *ecpA-hlyA-cnfl-sfaDE-papEF*, and *II*<sub>536</sub>*II*<sub>J96</sub>*IV*<sub>536</sub>*I*<sub>CFT0T3</sub>, *ecpA-pap*, respectively. In 2000, the first strain 3GC-resistant was a phylogroup-D CMY-2-ST1775-producer *E. coli*. About 33% (n=15/45) of the isolates from phylogroup-D were 3GC-resistant. Moreover, 29% (n=13/45) group-D *E. coli* were *pAmpC*-producers (harbouring *bla*<sub>CMY-2</sub>) and 2.2% were *pAmpC* and ESBLs producers (harbouring *bla*<sub>CMY-2</sub> and *bla*<sub>CTX-M-9</sub>). The following years group-D 3GC-resistant *E. coli* belonged mostly to ST648 (n=9) first identified in 2010, followed by ST1775 (n=3), ST405 (n=1) and ST354 (n=1) lineages. In 2004, the first CTX-M-15-producer *E. coli* strain appeared - the H30-Rx subclone of O25b:H4-ST131 human pandemic clone. Sixteen per cent (n=30/186) of phylogroup-B2 *E. coli* strains belonged to the

uropathogenic pandemic clone O25b:H4-ST131. Furthermore, three H30 and four H30-Rx subclones of O25b:H4-ST131 were found harbouring *bla*<sub>CTX-M-15</sub> or *bla*<sub>CTX-M-1</sub>. Among phylogroup-B1 strains, 6.8% (n=3/44) were 3GC-resistant. Phylogroup-B1 strains belonged to ST539, ST533, ST224 and were found to harbour *bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M1group</sub> and *bla*<sub>CTX-M-32</sub> respectively. Phylogroup-A 3GC-resistant *E. coli* (16.3%, n=8/49) harboured, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (n=1), *bla*<sub>CTX-M-32</sub> (n=1) and *bla*<sub>CTX-Mgroup</sub> (n=2) and belonged to ST23 (n=1), ST48 (n=1), ST88 (n=1) and ST609 (n=1).

**Conclusions:** This study shows that the predominant lineages responsible for the dissemination of resistance to third generation cephalosporins in companion animals are ST648, ST1775 and ST131 over a period of 17 years. The detection of *E. coli* lineages highly important for humans causing UTI in companion animals raises great public-health concerns regarding their role as reservoirs and the risk of transfer from humans to companion animals or vice-versa.



## **Anexo 5 – Resumo aceite para Comunicação em Poster no ASM MICROBE - 2016, Boston, Massachusetts, EUA**

### **Companion Animals are Reservoirs of High-Risk Human ESBL and AmpC-producing *Escherichia coli* Lineages**

A. Belas<sup>1</sup>, C. Marques<sup>1</sup>, A. Franco<sup>1</sup>, C. F. Pomba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas, CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

**Background:** The increase of ESBL and AmpC  $\beta$ -lactamases in companion animals is a great public health concern as they may act as reservoirs to humans. This study aimed to detect and characterize the *E. coli* lineages resistant to 3rd cephalosporin (3GC) causing urinary tract infection (UTI) in companion animals over 17 years in Portugal.

**Methods:** Antimicrobial susceptibility of 324 uropathogenic *E. coli* isolated from dogs and cats (1999 to April 2015) was studied by the disk diffusion method. The phylogenetic groups were determined for all strains by PCR. 3GC-resistant *E. coli* strains were typed by MLST and screened for 8 pathogenicity islands markers and 8 virulence genes.

**Results:** *E. coli* isolates were resistant to ampicillin 48% (n=154/324), 14.0% (n=45/324) to amoxicillin/clavulanate and 9.6% (n=31/324) to 3GC. *E. coli* B2 group was the most common (57.4%, n=186/324). 3GC-resistant *E. coli* group B2 and D strains had pathogenicity profiles and virulence-associated genes belonging mostly to  $I_{536}II_{J96}IV_{536}II_{CFT0T3}$ ,  $I_{536}II_{J96}IV_{536}I_{CFT0T3}II_{536}$ , *ecpA-hlyA-cnfl-sfaDE-papEF*, and  $II_{536}II_{J96}IV_{536}I_{CFT0T3}$ , *ecpA-pap*, respectively. In 2004, the first CTX-M-15-producer *E. coli* belonged to O25b:H4-ST131 human pandemic clone. About 33% (n=15/45) from group D *E. coli* were 3GC-resistant. Moreover, 29% (n=13/45) group D *E. coli* were *pAmpC* producers (harbouring *bla*<sub>CMY-2</sub>) and 2.2% were *pAmpC* and ESBLs producers (harbouring *bla*<sub>CMY-2</sub> and *bla*<sub>CTX-M-9</sub>). From 2010 group D 3GC-resistant *E. coli* belonged mostly to ST648 (n=9), followed by ST1775 (n=3), ST405 (n=1) and ST354 (n=1) lineages. Among group B1 strains, 6.8% (n=3/44) were 3GC-resistant. Group B1 strains belonged to ST539 (n=1), ST533 (n=1), ST224 (n=1) and were found to harbour *bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M1group</sub> and *bla*<sub>CTX-M-32</sub> respectively. Group A 3GC-resistant *E. coli* (16.3%, n=8/49) harboured, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (n=1), *bla*<sub>CTX-M-32</sub> (n=1) and *bla*<sub>CTX-Mgroup</sub> (n=2) and belonged to ST23 (n=1), ST48 (n=1), ST88 (n=1) and ST609 (n=1).

**Conclusions:** The detection of *E. coli* lineages highly important for humans causing UTI in companion animals raises great public-health concerns regarding their role as reservoirs and the risk of transfer to humans.

**Acknowledgments/ References:** This work was funded by national funds through the FCT—Fundação para a Ciência e Tecnologia UID/CVT/00276/2013 and a Ph.D. grant SFRH/BD/113142/2015 to Adriana Belas from the same institution.